



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYDROGELY S INKORPOROVANÝMI ENZYMÝ

HYDROGELS WITH INCORPORATED ENZYMES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Karolína Geistová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1382/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Karolína Geistová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Hydrogely s inkorporovanými enzymy

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše na téma inkorporace enzymů a měření jejich aktivity.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodný enzym a způsob stanovení jeho aktivity ve fázově separovaných hydrogelech na bázi hyaluronanu a tenzidu Septonexu.
- 3) Stanovit vliv jednotlivých složek a celého hydrogelového systému na aktivitu enzymu.
- 4) Zhodnotit využitelnost inkorporace zvoleného tenzidu do hydrogelů na bázi polymer–tenzid.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Karolína Geistová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem inkorporace enzymů do fázově separovaných hydrogelů. Cílem práce bylo stanovit enzymovou aktivitu ve fázově separovaných gelech. Gely byly připraveny metodou suché cesty na základě interakce záporně nabitého polyelektrolytu (hyaluronan) s kladně nabitým tenzidem (Septonex). K inkorporaci do hydrogelů byly použity dva enzymy, a to bromelain a kolagenasa, a ke stanovení jejich enzymové aktivity byl jako substrát použit modifikovaný protein albumin s navázanou sulfanilamidovou skupinou (azoalbumin). Ke zjištění enzymové aktivity samotného enzymu, enzymové aktivity ovlivněné jednou ze dvou složek systému a enzymové aktivity přímo v hydrogelu, byla použita metoda UV-VIS spektrofotometrie. Bylo zjištěno, že enzym lze inkorporovat do hydrogelu. Dále bylo zjištěno, že kladně nabitý tenzid má značný vliv na hodnotu aktivity enzymu ve fázově separovaných hydrogelech.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of incorporation of enzymes into phase separated hydrogels. The aim of this work is to determine the enzyme activity in phase separated gels. Gels were prepared by the dry-way based on the interaction of negatively charged polyelectrolyte (hyaluronan) with positively charged surfactant (Septonex). Two enzymes, bromelain and collagenase, were incorporated into the hydrogels. To determine enzyme activity, the modified albumin protein with bound sulfanilamide group (azoalbumin) was used as a substrate. The enzyme activity of the enzyme itself, the enzyme activity affected by one of the two components of the system as well as the activity of the enzyme directly in the hydrogel was determined on UV-VIS spectrophotometry. The enzyme was found to be incorporated in the hydrogel. Furthermore, a significant effect of the positively charged surfactant on the enzyme activity was detected in phase-separated hydrogels.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enzym, enzymová aktivita, Septonex, hyaluronan, hydrogel, UV-VIS spektrofotometrie

KEYWORDS

Enzyme, enzyme activity, Septonex, hyaluronan, hydrogel, UV-VIS spectrophotometry

GEISTOVÁ, Karolína. *Hydrogely s inkorporovanými enzymy*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113582>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D za pomoc při vedení celé práce, za cenné rady, trpělivost a ochotu. Dále také mé poděkování patří Ing. Petře Matouškové, Ph.D za pomoc při práci v laboratoři, za věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a Bc. Martině Havlíkové za její trpělivost, pomoc a čas, který mi věnovala při konzultacích. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům za podporu během studia a psaní bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Enzymy	8
2.1.1	Složení	8
2.1.2	Funkce	8
2.1.3	Enzymová aktivita	9
2.2	Enzymy používané ve farmacii	10
2.2.1	Enzymy pro léčbu poškozených tkání	10
2.3	Použité enzymy	11
2.3.1	Bromelain	11
2.3.2	Kolagenasa	11
2.4	Polyelektrolyty	11
2.4.1	Hyaluronan	12
2.5	Tenzidy	13
2.5.1	Struktura	13
2.5.2	Dělení	13
2.5.3	Septonex	14
2.6	Interakce polyelektrolyt – tenzid	14
2.7	Gely	15
2.7.1	Rozdělení gelů	15
2.7.2	Vznik gelů	15
2.7.3	Využití	16
2.7.4	Hydrogel	16
2.8	UV-VIS spektrofotometrie	17
2.8.1	Instrumentace	18
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	19
3.1	Inkorporace látek do hydrogelu	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Použité chemikálie	22
4.2	Stanovení enzymové aktivity	22
4.3	UV-VIS spektrofotometrie	23

4.4	Stanovení enzymové aktivity s přidáním Septonexu	23
4.4.1	Příprava zásobních roztoků.....	23
4.4.2	Stanovení enzymové aktivity s přidavkem Septonexu.....	24
4.5	Stanovení enzymové aktivity s přidáním hyaluronanu	24
4.5.1	Příprava zásobních roztoků.....	24
4.5.2	Stanovení enzymové aktivity s přidavkem hyaluronanu.....	24
4.6	Stanovení enzymové aktivity ve směsi.....	25
4.6.1	Příprava směsi a stanovení enzymové aktivity	25
4.7	Stanovení enzymové aktivity v hydrogelu	26
4.7.1	Příprava hydrogelů a stanovení enzymové aktivity	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
5.1	Aktivita enzymů	27
5.2	Aktivita enzymů při dlouhodobém skladování	27
5.3	Aktivita enzymů s přidavkem Septonexu	29
5.4	Aktivita enzymů s přidavkem hyaluronanu	31
5.5	Aktivita enzymů ve směsi.....	32
5.6	Aktivita enzymů v hydrogelu.....	34
6	ZÁVĚR.....	37
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	39
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	42
8.1	Seznam použitých zkratk	42
8.2	Seznam použitých symbolů	42

1 ÚVOD

Hydrogely jsou systémy tvořené trojrozměrnou polymerní sítí, které vznikají fázovou separací, při níž dochází ke spojení dvou složek – polyelektrolytu a tenzidu. Mezi polyelektrolytem a tenzidem s opačnými náboji dochází díky elektrostatickým interakcím k silnému fyzikálnímu vázání. Právě díky těmto interakcím mají hydrogely unikátní vlastnosti, jako je biodegradabilita, biokompatibilita, nerozpustnost ve vodném prostředí a schopnost absorbovat velké množství vody. Tyto vlastnosti jsou odpovědné za velkou popularitu hydrogelů a díky nim hydrogely zaujímají v dnešní době široké uplatnění v různých odvětvích. Nejvíce se využívají ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v tkáňovém inženýrství a v kosmetickém průmyslu. Další vlastností, která je velmi přínosná pro využití v biomedicině, je podobnost hydrogelů s živými tkáněmi. V dnešní době mohou být hydrogely využity jako krycí materiál pro hojení ran a keloidních jizev. Krycí materiál lze vylepšit inkorporací proteolytického enzymu do hydrogelu.

Cílem této bakalářské práce je stanovit enzymovou aktivitu ve fázově separovaných hydrogelech na bázi hyaluronanu a tenzidu Septonexu a stanovit vliv jednotlivých složek na aktivitu enzymu. Potenciálním využitím hydrogelů s inkorporovanými proteolytickými enzymy jsou právě krycí materiály pro hojení ran a keloidních jizev díky tomu, že proteolytické enzymy mají protizánětlivé účinky a mají schopnost odstraňovat nekrotickou tkáň. Náplní mé práce bylo tedy pomocí UV-VIS spektrofotometrie stanovit vliv jednotlivých složek a celého hydrogelového systému na aktivitu enzymu. Použité enzymy pro stanovení aktivity a přípravu hydrogelů byly bromelain a kolagenasa, díky tomu, že jsou to nejčastěji používané proteolytické enzymy pro léčbu poškozených tkání.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Enzymy

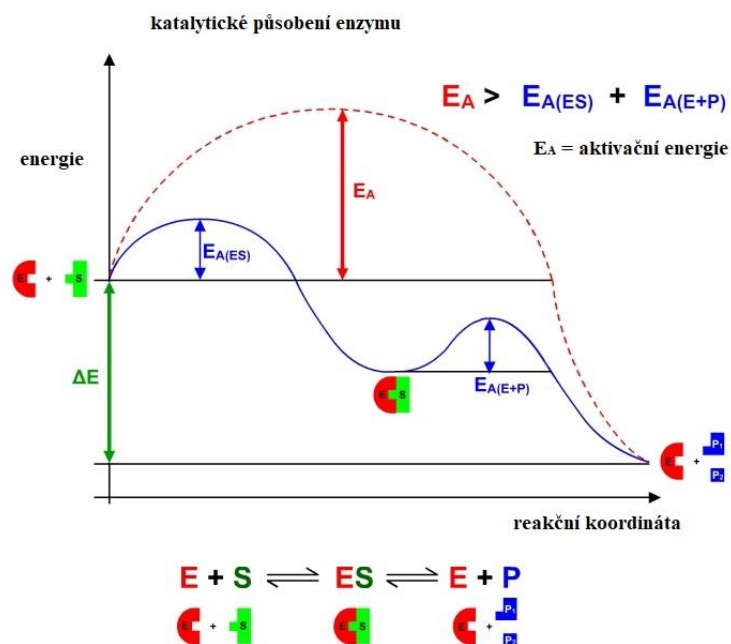
Enzymy jsou biokatalyzátory, které se podílejí na řízení a koordinaci organizovaného a vysoce integrovaného souboru chemických reakcí a s ním spojených energetických změn. Jsou to bílkovinné makromolekuly nebo jsou tvořeny molekulou RNA obdařené katalytickými funkcemi a urychlují chemické přeměny. Enzymy nacházíme ve všech živých systémech a předpokládá se, že i nejjednodušší buňky obsahují přes 3 000 enzymů [1].

2.1.1 Složení

Většina enzymů je bílkovinné povahy a jsou to jak bílkoviny složené, tak i jednoduché. Některé enzymy jsou tvořeny pouze polypeptidovým řetězcem či řetězcem. Jiné enzymy mají strukturu složených bílkovin a nazývají se holoenzymy. Obsahují neproteinovou složku nazývanou kofaktor a bílkovinou složku – apoenzym. Kofaktorem může být buď nízkomolekulární látka zvaná koenzym, která není pevně vázána na enzym, nebo pevně vázaná struktura, tzv. prostetická skupina. Nejdůležitější částí molekuly enzymu je aktivní místo (centrum). Do aktivního místa se pomocí vazebných skupin vážou substráty a jsou v něm přeměňovány pomocí katalytických skupin na produkty [2].

2.1.2 Funkce

Enzym má katalytickou funkci, kterou může vykonávat buď jednoduchá, nebo většinou složená bílkovina. Nebílkovinná část enzymu povahy složených bílkovin se obecně nazývá kofaktor. Enzymy, stejně jako katalyzátory používané v chemii, urychlují reakce, aniž by při tom ovlivňovaly složení rovnovážné směsi, neboť zvyšují rychlost reakce oběma směry. Směr průběhu reakce není ovlivněn katalyzátorem, ale je dán energetickými a koncentračními poměry v reagujícím systému (Obrázek 1) [1].



Obrázek 1: Závislost energie na průběhu chemické reakce [3].

Enzymy jsou oproti umělým biokatalyzátorům účinnější. Jediná molekula enzymu je schopna během jedné sekundy přeměnit až $5 \cdot 10^4$ molekul substrátu, výjimečně i více. To odpovídá značným reakčním rychlostem, které až o několik řádů převyšují rychlosti dějů realizovaných umělými katalyzátory [1].

Pracují většinou za mírných podmínek (teplota 20-40 °C, tlak 0,1 MPa, pH kolem 7). Jejich účinek lze snadno regulovat, a to dokonce na několika úrovních. Nezanedbatelnou předností enzymů při jejich průmyslových aplikacích je i jejich netoxicitu, na rozdíl od umělých katalyzátorů, které jsou většinou toxické [1].

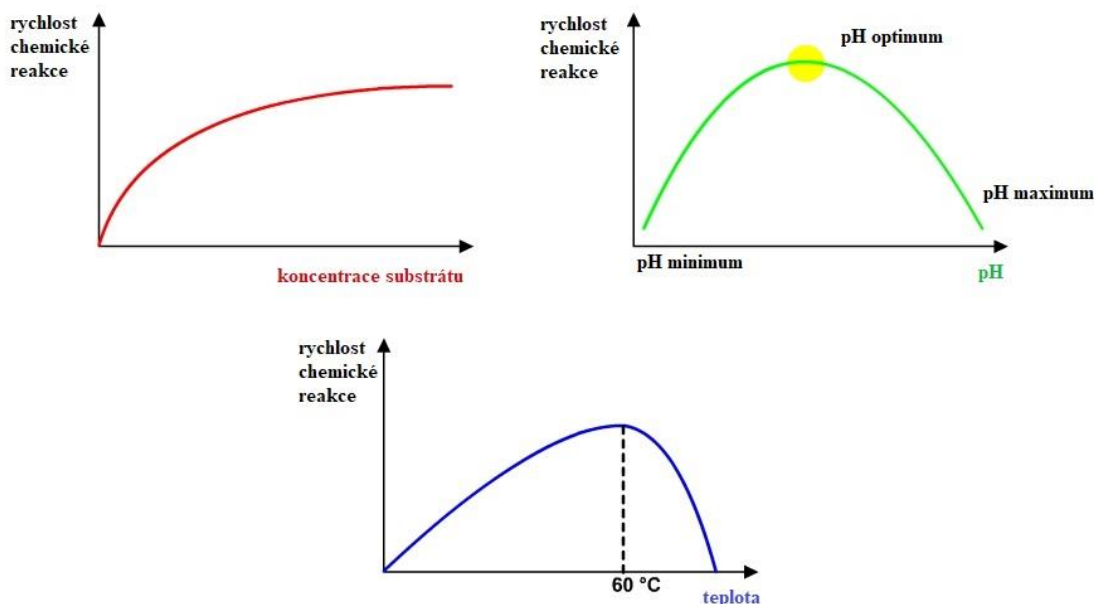
Enzymy se dále vyznačují značnou specifitou. Prvním příkladem je substrátová specifita, kdy každý enzym obvykle katalyzuje pouze určitou reakci určitého substrátu (výchozí látky). Druhým příkladem je specifita účinku, kdy určitý enzym katalyzuje pouze jednu z mnoha možných přeměn substrátu a třetím příkladem je stereospecifita. Stereospecifita je schopnost enzymu rozpoznat v racemické směsi jeden z enantiomerů a pouze ten přeměnit, dále při syntéze chirální molekuly z achirální syntetizovat pouze jediný z možných enantiomerů. Stereospecifita je důsledkem toho, že enzym (a tedy i jeho aktivní centrum) je vybudováno z chirálních monomerních jednotek, a je proto chirální jako celek [4].

2.1.3 Enzymová aktivita

Činnost enzymů úzce souvisí s jejich aktivitou. Aktivita enzymů je definována jako rychlost katalyzované reakce. Její základní jednotkou je katal. 1 katal (kat) vyjadřuje množství enzymu, které způsobí přeměnu jednoho molu substrátu za sekundu [1].

Enzymová aktivita může být ovlivněna mnoha různými aspekty. Prvním příkladem je teplota, kdy s rostoucí teplotou vzrůstá rychlost všech reakcí, tedy i enzymově katalyzovaných. Pokud však u enzymových reakcí přestoupí teplota kritickou hodnotu, dojde k tepelné denaturaci bílkovinné molekuly enzymu a rychlost enzymové reakce začne klesat. Největší aktivita enzymů je většinou při teplotě kolem 37 °C, většina enzymů ztrácí aktivitu při teplotě kolem 55-60 °C, existují však enzymy termofilních bakterií, které jsou aktivní i při 85 °C. Druhým příkladem je pH, kdy většina enzymů katalyticky působí jen v určité oblasti pH (tzv. pH-optimum). Tato vlastnost souvisí s disociačním stavem kyselých a bazických skupin aktivního centra. Většina enzymů má pH-optimum v neutrálním či slabě kyselém prostředí, extrémních hodnot dosahuje pH-optimum trávicích enzymů. Třetím příkladem jsou modifikátory. Buď jsou to látky zvyšující rychlost enzymové reakce (aktivátory), nebo jsou to látky, které snižují rychlost enzymové reakce (inhibitory) [4].

faktory ovlivňující rychlost enzymových reakcí



Obrázek 2: Závislost rychlosti katalyzované reakce na koncentraci substrátu, na pH a na teplotě [3].

2.2 Enzymy používané ve farmacii

Enzymy, které se používají jako léčiva, mají dvě důležité vlastnosti, které je odlišují od všech ostatních typů léčiv. První charakteristická vlastnost enzymu je vysoce afinitní a specifická vazba na substrát. Druhá vlastnost je schopnost enzymu mnohokrát přeměnit substrát na požadovaný produkt. Tyto dva rysy dělají z enzymů specifické a velmi účinné složky léků. Jiné molekuly se těmito vlastnostmi nevyznačují. Tyto vlastnosti vedly k vývoji mnoha léků, které se uplatňují v mnoha odvětvích medicíny [5].

2.2.1 Enzymy pro léčbu poškozených tkání

Nejčastěji využívané enzymy pro léčbu poškozených tkání jsou, díky svým jedinečným vlastnostem, enzymy proteolytické. Mají protizánětlivý účinek, který je způsobený fibrinolytickou aktivitou (aktivace endogenních proteáz – plazmin) a mají schopnost odstraňovat nekrotickou tkáň. Enzymatické odstranění nekrotické tkáně z rány je mnohem šetrnější a nepoškozuje zdravou tkáň, než mechanické nebo chemické čištění ran. Gelový obvaz, který obsahuje směs proteolytických enzymů, výrazně zkracuje dobu, kdy se odlučuje nekrotická tkáň od zdravé tkáně a snižuje riziko infekce a rozsah zjizvení [6].

Bromelain a kolagenasa jsou nejčastěji používané proteolytické enzymy v přípravcích pro léčbu poškozených tkání. Vibrilasa je proteolytický enzym z mořského mikroorganismu *Vibrio proteolyticus*. Má schopnost odstraňovat denaturované proteiny, jako jsou ty, které se nacházejí v spálené kůži. Chondroitinasy a hyaluronidasy mají schopnost regenerovat poškozené nervové tkáně. Enzymy působí tak, že odstraňují nahromaděný chondroitin sulfát, který inhibuje růst axonu [5].

2.3 Použité enzymy

2.3.1 Bromelain

Bromelain patří mezi rostlinné cysteinové proteasy. Je získáván jako surový vodný extrakt ze stonků a nezralých plodů ananasu (Obrázek 3), což představuje neobvykle složitou směs různých thiol-endopeptidázy a dalších. Dosud zcela charakterizované složky jsou fosfatázy, glukozidasy, peroxidasy, celulasy, glykoproteiny a sacharidy. Kromě rostlinných cystein-proteináz, bromelain obsahuje proteinasy ze zvířecích orgánů, jako je trypsin a chymotrypsin. Bromelain má antiedematózní, protizánětlivé, antitrombotické a fibrinolytické účinky. Dále se používá při hojení ran a odstraňování nekrotické tkáně. Má schopnost hydrolyzovat vlákna kolagenu. pH optimum pro enzymatickou aktivitu je mezi 5,5 a 8,0. Spektrum substrátu je podobně široké, od nízkomolekulárních molekul, amidů a dipeptidů až po vysokomolekulární substráty, jako je fibrin, albumin, kasein [7].



Obrázek 3: *Ananas comosus* [8].

2.3.2 Kolagenasa

Kolagenasy jsou endopeptidázy, neboli enzymy, které jsou schopné štěpit peptidické vazby v trojitě šroubovici molekuly kolagenu. Kolagen je hlavní složkou živočišné extracelulární pojivové tkáně. Kolagenasa je průmyslově produkována díky bakterii *Clostridium histolyticum*. Tato bakterie má v sobě dva oddělené a odlišné geny, a proto je schopna produkovat dva typy kolagenasy. Kolagenasa typu I. tvoří peptidický řetězec s 936 aminokyselinami a kolagenasa typu II. je peptid s 1 021 aminokyselinami. Bakteriální kolagenasa vykazuje širší substrátovou specifitu než kolagenasy živočišné [9].

Kolagenasy jsou využívány k izolaci adipocytů, hepatocytů, kardiomyocytů, epitelu tkáně nadledvin a dalších. Využívají se také ve směsi s proteolytickými enzymy k velmi šetrnému ošetření tkání např. po popálení [9].

2.4 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou makromolekulární látky, které ve své struktuře obsahují postranní skupiny, jež jsou schopné elektrolytické disociace v polárních rozpouštědlech. Prostřednictvím disociace dostáváme takzvaný makroiont a k němu protiiont, který má příslušný počet malých iontů opačného náboje. Makroiont disponuje velkým počtem nábojů. Pokud má makroiont kladný náboj, tak se nazývá makrokationt, v případě, že má záporný náboj, nazývá se makroaniont. Polyelektrolyty lze rozdělit podle toho, zda disociují úplně

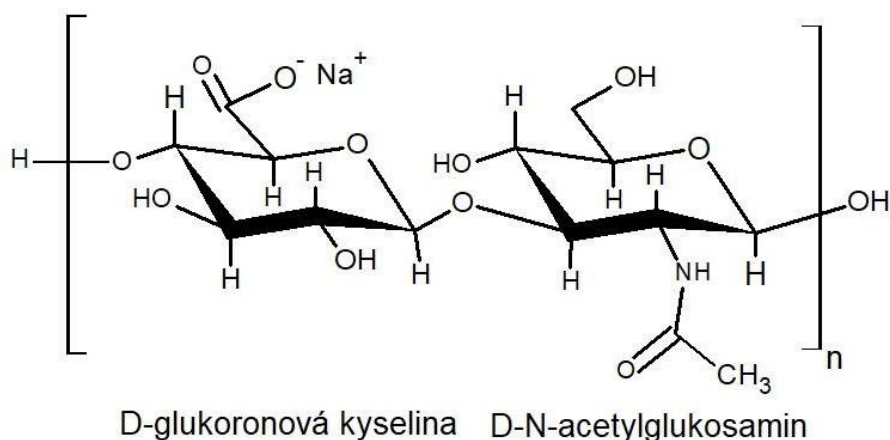
(polyelektrolyty silné) nebo jen částečně (slabé polyelektrolyty). Dále dělíme polyelektrolyty podle toho, jakou skupinu mají k sobě kovalentně navázanou. Polyanionty k sobě mají kovalentně vázané aniontové skupiny a polykationty mají vázané kationtové skupiny. Polyelektrolyty, které obsahují jak aniontové skupiny, tak i kationtové, se nazývají amfoterní polyelektrolyty (amfolyty). Mezi tyto elektrolyty patří i přírodní látky jako např. proteiny [9].

Výsledné chování polyelektrolytů je ovlivněno tím, v jaké formě je daný elektrolyt. Může být buď ve formě roztoku, nebo může jít o polyelektrolyt na nabitěm povrchu. Chování polyelektrolytů dále závisí na koncentraci polyelektrolytu, hustotě náboje na řetězci, pravidelnosti uspořádání ionizovaných skupin podél řetězce kvalitě rozpouštědla pro polymerní kostru, přítomnosti jiných látek [11].

2.4.1 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová byla objevena v roce 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem. Tito pánové publikovali článek v Journal of Biological Chemistry o neobvyklém polysacharidu s extrémně vysokou molekulovou hmotností izolovanou ze sklivce skotu. Během druhé poloviny dvacátého století byla kyselina hyaluronová (HA) objevena v různých tkáních a tekutinách obratlovců včetně člověka [12].

Ve vodném roztoku se HA nevyskytuje ve formě kyseliny, ale v disociované formě sodné nebo draselné soli a je tedy znám pod názvem hyaluronan. Hyaluronan (Hya) je lineární polysacharid tvořený disacharidovými jednotkami obsahujícími N-acetyl-D-glukosamin a kyselinu glukuronovou, které jsou střídavě spojené β 1-4 a β 1-3 glykosidickou vazbou (Obrázek 4). Má vysokou molekulovou hmotnost, obvykle v řádu miliónů daltonů, a zajímavé viskoelastické vlastnosti ovlivněné jeho polymerními a polyelektrolytovými vlastnostmi. Taková vysoká molární hmotnost a s ní spojené jedinečné viskoelastické a reologické vlastnosti předurčují hyaluronan k tomu, aby hrály důležité fyziologické role v živých organismech a učinily z něj atraktivní biomateriál pro různé lékařské aplikace. Nachází se v lidském těle a jiných obratlovcích, nejvyšší množství hyaluronanu je však v měkkých pojivových tkáních. Kromě obratlovců je Hya také přítomen v kapslích některých bakterií (např. kmen *Streptococcus*), ale chybí v houbách, rostlinách a hmyzu. Největší obsah Hya se nachází v kohoutích hřebenech [13].



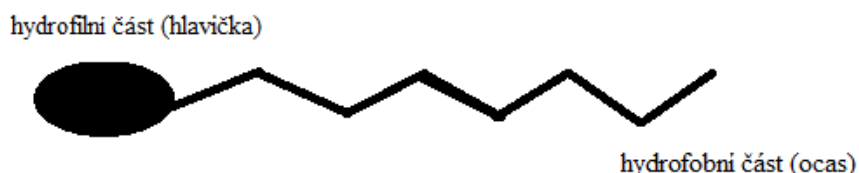
Obrázek 4: Struktura hyaluronanu sodného [14].

Hyaluronan je využíván především pro oční chirurgii, léčbu onemocnění kloubů a estetickou medicínu. Lékařské studie Hya zahrnují jeho úlohu v hnojení, embryogenezi, rozvoji imunitní odpovědi, hojení ran, onkologických a infekčních onemocněních, procesech stárnutí a problematice estetické medicíny. Hyaluronan je široce používán v aplikované biochemii a enzymologii jako substrátu pro kvantitativní stanovení enzymu hyaluronidázy [15].

2.5 Tenzidy

2.5.1 Struktura

Tenzidy jsou obecně povrchově aktivní látky, které se vyznačují tím, že snižují povrchové napětí kapalin. Jsou schopné hromadit se již při nízké koncentraci na fázovém rozhraní, a tím snižovat mezifázovou energii soustavy. Mají amfifilní charakter, což znamená, že obsahují jak polární (hydrofilní), tak i nepolární část (hydrofobní). Polární část molekuly je obvykle tvořena polární skupinou jako např. COOH , SO_3H . Nepolární část je tvořena dlouhým uhlíkatým řetězcem. Na fázovém rozhraní se orientují tak, že nepolární část molekuly tenzidu směřuje do nepolární fáze, zatímco polární část molekuly do polární fáze [16].



Obrázek 5: Obecné schéma molekuly tenzidu.

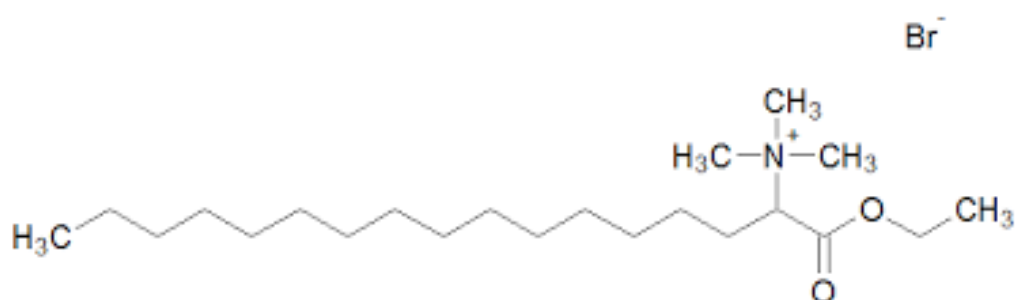
2.5.2 Dělení

Tenzidy dělíme podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku na tenzidy iontově aktivní a iontově neaktivní. Iontové tenzidy dále dělíme na aniontové a kationtové [16].

Aniontové tenzidy patří mezi nejrozšířenější povrchově aktivní látky. Ve vodném prostředí disociují za vzniku aniontů, tzn., že mají záporný náboj. Jsou tvořeny alkalickými soli vyšších mastných kyselin. Typickým příkladem je mýdlo. Mezi kationtové tenzidy zařazujeme především kvartérní amoniové soli. Ve vodném prostředí disociují za vzniku kationtů. Jejich účinek je především mikrobicidní a také avivážní (antistatická úprava syntetických textilií po praní). Některé tenzidy se používají jako antiseptika, protože mají negativní vliv na grampozitivní mikroorganismy, např. Ajatin (benzylododecyldimethylamoniumbromid), Septonex (trimethyl [1-(ethoxy-karbonyl)pentadecyl]amoniumbromid). Amfoterní tenzidy jsou zvláštní tím, že obsahují v polární části molekuly jak kladný tak záporný náboj. Jejich náboj závisí na hodnotě pH. Z přírodních látek mezi ně patří např. rozpustné proteiny, fosfatidylcholin, fosfatidylserin, sfingomyelin. Ze syntetických tenzidů mají význam zejména deriváty betainu. Neiontové tenzidy neobsahují v polární části molekuly náboj tzn., že nejsou schopné disociace. Jedná se především o ethery nebo estery polyethylenglykolu [16].

2.5.3 Septonex

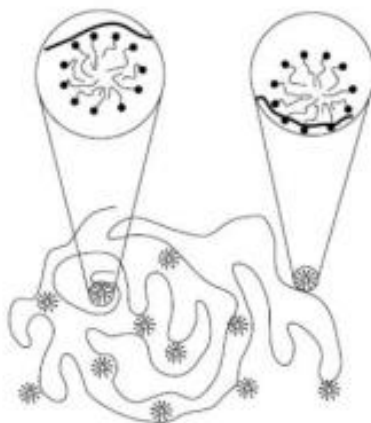
Septonex, nebo-li karbethopendecinium-bromid, je kationaktivní tenzid, jehož náboj je ve vodném prostředí kladný. Je tvořen dlouhým uhlíkatým řetězcem (hydrofobní část) a kvartérním aminem (hydrofilní část). Jedná se tedy o kvartérní amoniovou sůl. Její krystalický prášek má bílou až mírně nažloutlou barvu a je velmi dobře rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech. Má antiseptické a baktericidní účinky, neboť vyvolává změny v permeabilitě buněčné membrány bakterií. Působí především na grampozitivní bakterie. Bakterie druhu *Pseudomonas* a *Mykobakterium tuberculosis* vůči Septonexu zůstávají rezistentní [17].



Obrázek 6: Strukturní vzorec Septonexu [18].

2.6 Interakce polyelektrolyt – tenzid

Problematika interakcí mezi polyelektrolytem a tenzidem je už pár desítek let předmětem mnoha studií a to díky nárůstu využití těchto komplexů v komerčních produktech. Jsou známy dva typy interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, a to hydrofobní a elektrostatické. Hydrofobní interakce se objevuje u polymerů, které mají ve své struktuře hydrofobní části nebo skupiny. Elektrostatické interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem se projevují především u polyelektrolytů, které mají opačný náboj než tenzidy. Díky interakcím mezi polyelektrolyty a tenzidy dochází k tvorbě klastrů, které jsou podobné micelám. Klastry jsou navázány na řetězec polymeru a tato struktura svým tvarem připomíná perlový náhrdelník [19].



Obrázek 7: Struktura perlového náhrdelníku [19].

2.7 Gely

Gel je koloidní disperze tuhých látek v kapalinách. Schopnost vytvářet gely mají například roztoky makromolekul či lyofobní soly. Z hlediska struktury lze gel definovat jako systém tvořený trojrozměrnou sítí, vytvářející souvislou strukturu, která prostupuje celým disperzním prostředím. Spojité je tedy jak disperzní prostředí, tak i disperzní podíl. Síly, které působí adhezi disperzních částic, jsou buď chemického, nebo fyzikálního charakteru. Gely disponují mechanickými vlastnostmi, které jsou charakteristické pro tuhý stav, i přes to že je jejich disperzní prostředí kapalné. Mechanické vlastnosti gelů jsou způsobené gelotvornými činidly, které vytvářejí makromolekulární síť prostupující celým disperzním systémem. Tato síť disponuje svojí makroskopickou velikostí a výbornou elasticitou [16].

2.7.1 Rozdělení gelů

Gely můžeme dělit podle různých kritérií. Dělíme je podle chemického složení disperzního podílu na gely anorganické a organické a podle charakteru disperzního prostředí je dělíme na hydrogely (vodné disperzní prostředí) a organogely (disperzní prostředí tvořené organickým rozpouštědlem, např. ethanolem). V neposlední řadě je dělíme také podle jejich chování ve vysušeném stavu, a to na gely reverzibilní a ireverzibilní [16].

Reverzibilní gely při vysoušení zmenšují svůj objem a získáváme z nich kompaktní xerogely (systém, který obsahuje pouze disperzní podíl). Mají schopnost přecházet do původního stavu díky přijímání disperzního prostředí, tj. bobtnáním. Jedná se tedy o vratný proces a tyto vlastnosti vykazují především makromolekulární gely [16].

Ireverzibilní gely vznikají gelatinizací lyofobních solů. Ve vysušeném stavu mají přibližně stejný objem jako původní lyogel, avšak jsou porézní. Jsou schopné sorbovat část kapaliny při styku s disperzním prostředím, ale do původního stavu se nevracejí. To znamená, že přeměna ireverzibilního gelu na xerogel je nevratná a nastává u lyofobních koloidů [16].

2.7.2 Vznik gelů

Gelace je proces, který označuje spojení makromolekulárních řetězců dohromady, které zpočátku vedou k postupně větším rozvětveným, ale rozpustným polymerům v závislosti na struktuře a konformaci výchozího materiálu. Směs takového polydisperzního rozvětveného polymeru se nazývá sol. Pokračování spojovacího procesu vede ke zvětšení velikosti rozvětveného polymeru s klesající rozpustností. Tento „nekonečný polymer“ se nazývá gel nebo síť a proniká konečnými rozvětvenými polymery. Přechod ze systému s konečným rozvětveným polymerem na nekonečné molekuly se nazývá přechod sol-gel (nebo gelace) a kritický bod, ve kterém se nejprve objeví gel, se nazývá gelový bod [20].

Ke vzniku gelů může docházet buď z roztoku, nebo v případě reverzibilních gelů, z pevného stavu. Gel může vznikat z roztoku v důsledku změny ve fyzikálním stavu roztoku nebo v důsledku chemické reakce. Z pevného stavu vznikne gel tzv. bobtnáním již existujícího xerogelu po přidání disperzního prostředí [16].

2.7.3 Využití

Gely a samotný proces gelatinizace mají velký význam v lékařství, biologii a farmacii. Gelatinizace vysokomolekulárních látek je také velmi důležitý technický proces, který se využívá při výrobě vláken, aplikaci lepidel, zpracování kůží atd. Dále se gely využívají v potravinářském průmyslu [16].

2.7.4 Hydrogel

Hydrogel je název pro trojrozměrné síťové struktury získané ze třídy syntetických nebo přírodních polymerů, které mohou absorbovat a zadržovat značné množství vody. Hydrogenní struktura je vytvořena hydrofilními skupinami nebo doménami přítomnými v polymerní síti při hydrataci ve vodném prostředí [20].

Hydrogely můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou chemické gely, které se vyznačují tím, že jsou kovalentně zesíťovány (nahrazují vodíkovou vazbu silnějšími a stabilnějšími kovalentními vazbami). Nemohou se rozpouštět, pouze pohlcují kapalinu, a proto se někdy nazývají jako gely permanentní. Druhou skupinou jsou fyzikální gely, které se naopak vyznačují tím, že jsou zesíťovány pomocí slabších fyzikálních interakcí nebo sekundárními silami, včetně iontových, vodíkových vazeb nebo hydrofobních interakcí [20].

Voda je nejdůležitější složkou hydrogelu, protože vyplňuje prostor mezi makromolekulami a tvoří víc než 90% hmotnosti hydrogelu. Kapacita zadržování vody a propustnost jsou nejdůležitějšími charakteristickými znaky hydrogelu. Polární hydrofilní skupiny jsou první, které se hydratují při styku s vodou, což vede k tvorbě primární vázané vody. Primární vázanou vodu je obtížné oddělit. V důsledku toho síť nabobtná a odhaluje hydrofobní skupiny, které jsou také schopny interakce s molekulami vody. To vede k tvorbě hydrofobně vázané vody, také nazývané sekundárně vázaná voda. Další absorbovaná voda se nazývá volná voda. Je to voda ve vnější vrstvě a k absorpci této vody dochází díky osmotické hnací síle, která vyplňuje mezisíťový prostor. Volná voda vyplňuje prostor mezi řetězci sítě a způsobuje rozšiřování póru a dutin v hydrogelu [20].

Biodegradovatelné hydrogely obsahují labilní vazby, a jsou proto výhodné v aplikacích, jako je tkáňové inženýrství, hojení ran a dodávání léčiv. Tyto vazby mohou být přítomny buď v základní struktuře polymeru, nebo v příčných vazbách použitých pro přípravu hydrogelu. Labilní vazby mohou být rozrušeny za fyziologických podmínek buď enzymaticky nebo chemicky, ve většině případů hydrolýzou. Biokompatibilita je důležitou vlastností, kterou hydrogel požaduje. Hydrogely by v ideálním případě měly být metabolizovány na neškodné produkty. Obecně mají hydrogely dobrou biokompatibilitu, protože jejich hydrofilní povrch má nízkou mezifázovou volnou energii, když je v kontaktu s tělními tekutinami, což má za následek nízkou tendenci přilnutí proteinů a buněk k těmto povrchům [20].

Hydrogely se používají v mnoha oblastech. Je to dáno jejich specifickou strukturou a flexibilitou, která je způsobena obsahem vody a umožňuje použití v průmyslových odvětvích, tak i v biologických. Využití hydrogelů v lékařství je umožněno díky biologické kompatibilitě a netoxicitě materiálů použitých k jejich výrobě [21]. Hydrogely mnoha syntetických a přírodních polymerů se využívají hlavně v tkáňovém inženýrství, farmaceutickém a biomedicínském oboru. Jsou použity v obvazech na rány, při podávání

léků, transdermálních systémech, dentálních materiálech, implantátech, injekčních polymerních systémech a očních aplikacích [20].

2.8 UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie se řadí mezi spektrální metody, což znamená, že je založená na principu výměny energie mezi látkou a elektromagnetickým zářením. Spektrum je závislost veličiny, která je mírou intenzity záření vysílaného nebo prošlého vzorkem na vlnové délce záření. Dále se u ultrafialové a viditelné spektrometrie sleduje pohlcení (absorpce) záření vzorkem, a proto se také tato metoda nazývá absorpční [22].

Základní myšlenka této metody je měření absorpce ultrafialového a viditelného záření zředěnými roztoky molekul v rozsahu 200 až 800 nm. Principem spektrofotometrie je interakce mezi vazebnými a nevazebnými elektrony umístěnými v orbitalech molekuly s fotony UV-VIS záření. Za běžných podmínek elektrony excitovány nejsou, protože se molekula nachází na základní vibrační hladině. Při absorpci fotonu však molekula přijme energii, díky níž dochází k přechodu elektronu do excitovaného stavu. Elektrony přecházejí do vyšší excitační hladiny, přičemž dochází k absorpci určitého množství záření o konkrétní energii a tedy i o konkrétní vlnové délce. Je absorbována vždy jen ta část elektromagnetického záření, která svou energií odpovídá přechodu elektronu ze základní hladiny do hladiny excitované. Díky tomu jsou molekulová absorpční spektra ve své podstatě i spektra elektronová. Elektronové absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce. Fotony UV a VIS záření disponují takovou energií, pomocí které jsou schopné excitovat jak elektronové stavy, tak i stavy vibrační a rotační. Výsledné absorpční spektrum je pak pásové, protože při registraci jednotlivé diskrétní přechody zpravidla splývají. Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Pás popisujeme pomocí vlnové délky maxima pásu. Vlnová délka maxima pásu souvisí s energií absorbovaného záření a to tak, že je totožná s rozdílem energií hladin, mezi kterými elektron přechází. Polohu pásu určují energie orbitalů, mezi nimiž dochází k přechodu elektronů při excitaci. Vnitřní energie molekuly je dána součtem energie elektronové, vibrační a rotační a tyto energie nabývají jen takové diskrétní hodnoty, které odpovídají jejich hladinám energie. Největší rozdíl energií je mezi základní a excitovanou hladinou (10^2 kJ/mol). Menší rozdíl je mezi energiemi sousedních vibračních hladin a nejmenší mezi energiemi rotačních hladin.

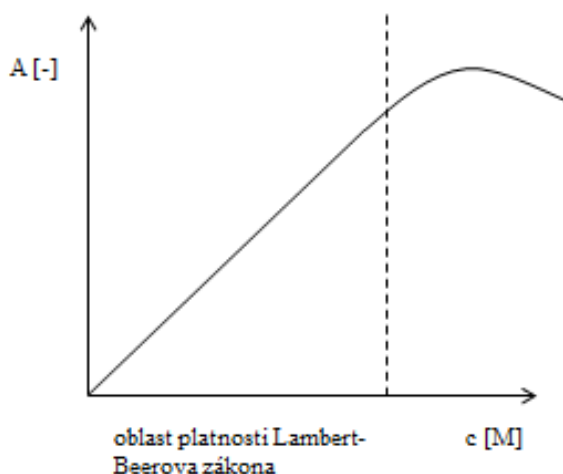
Ve spektrofotometrii se nejčastěji měří veličina, která vyjadřuje propustnost a nazývá se absorbance. Absorbance je záporně vzatý dekadický logaritmus transmitance a je dán poměrem dopadajícího zářivého toku k prošlému:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad [22]. \quad (1)$$

Absorpční spektrum je závislost absorbance (méně často transmitance) na vlnových délkách záření a slouží k posouzení absorpce záření vzorkem. Skládá se ze souboru pásů odpovídajících jednotlivým energetickým přechodům a poloha těchto pásů se využívá při kvalitativní analýze. U kvantitativní analýzy se uplatňuje Bouguer-Lambert-Beerův zákon [23]. Tento zákon nám říká, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy (Obrázek 8). Lambert-Beerův zákon platí pouze pro velmi zředěné roztoky do koncentrace zhruba 10^{-2} mol/l. Dále je uvedený vzorec:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (2)$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] a l je tloušťka absorbující vrstvy [24].



Obrázek 8: Závislost absorbance na koncentraci [22].

U spektrofotometrie najdeme různé možnosti využití, jak při kvalitativní analýze, tak při kvantitativní. Při kvalitativní analýze využíváme spektrofotometrii k identifikaci neznámé organické látky díky porovnání změřeného spektra se známými spektry. U kvantitativní analýzy měříme absorbanci, pomocí které jsme schopni zjistit koncentraci sloučenin. Většinou používáme metodu kalibrační křivky [22].

2.8.1 Instrumentace

Spektrofotometry se skládají ze zdroje záření, optické soustavy pro vedení paprsku, prvku pro výběr vhodné vlnové délky, zařízení pro umístění vzorku a detektoru záření. Zdrojem záření pro viditelnou oblast světla je wolframová a halogenová žárovka, pro ultrafialovou oblast deuteriová lampa. Monochromátor je zařízení, které je složeno ze vstupní štěrbin, disperzního prvku a výstupní štěrbin a slouží k rozkladu vstupujícího polychromatického záření na jednotlivé monochromatické paprsky, ze kterých je vybrána požadovaná vlnová délka. Disperzním prvkem může být hranol, filtr nebo mřížka. Štěrbin vybírají pouze určitou část dopadajících paprsků. Šířkou štěrbin lze měnit intenzitu záření dopadajícího na detektor. Vzorek umístíme do kyvety, pro viditelnou oblast světla se používá skleněná a pro ultrafialovou oblast křemenná. Poslední součástí spektrofotometru je detektor elektromagnetického záření, který slouží k měření intenzity záření, které vzorkem prošlo. Detektory mohou být fotonásobiče, polovodičové fotoelektrické články, diodová pole a detektory CCD [22].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Inkorporace látek do hydrogelu

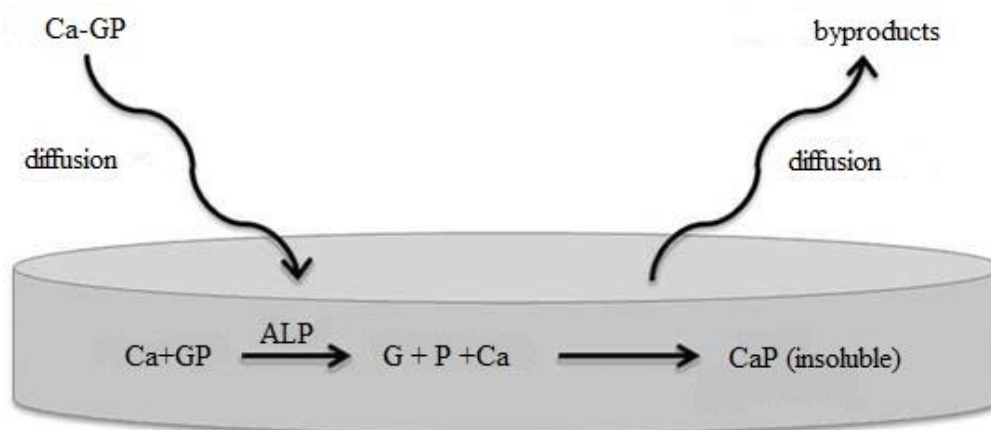
M. Üner a spol. se ve své práci zabývali inkorporací askorbyl palmitátu (AP) v nanočásticích pevných lipidů (SLN), nosičích nanostrukturovaných lipidů (NLC) do hydrogelu. AP je antioxidant podobný vitaminu C, který vykazuje aktivitu zachycovače volných radikálů, inhibiční účinky na melanogenezi, antiagingové vlastnosti a jeho zvlhčovací aktivita je vysoká. Cílem jejich studie bylo zkoumat potenciál hydratace AP v SLN a NLC začleněném do hydrogelu jako do koloidního nosného systému pro lepší průnik léků do kůže. Mnohé léky jsou chemicky a biologicky labilní, a proto musí být zachyceny v nosném systému. SLN a NLC jsou jedním z nejslibnějších systémů koloidních nosičů a jejich inkorporací do hydrogelu vylepšili chemickou a fyzikální stabilitu účinné složky v SLN a NLC. Je známo, že SLN a NLC mají okluzivní účinky, ale tým M. Ünera zjistil, že včlenění AP zvlhčilo kůži významně lépe než placebo v krátkodobé i dlouhodobé studii. Pronikání léků do kůže tedy silně záviselo na hydrataci kůže [25].

M. A. Casadei a spol. se zabývali ve své studii přípravou nanočástic pevných lipidů (SLN) obsahující léčivo ibuprofen a inkorporací těchto nanočástic do dextranového hydrogelu. Nanočástice byly připraveny z Preciol ATO 5 jako lipidovou fází technikou homogenizace za horka a charakterizovány analýzou velikosti částic a měření zeta potenciálu. Přidáním dextranmethakrylátu (DEX-MA) do vodné fáze a předložením směsi UV ozáření byly připraveny systémy SLN (s léčivem i bez) zabudované do dextranového hydrogelu. Nakonec byly provedeny studie rozpouštění ibuprofenu z lyofilizovaných vzorků. Srovnání profilů uvolňování ibuprofenu ze SLN, dextranového hydrogelu (DEX-MA) a z dextranového hydrogelu s inkorporovanými SLN potvrdilo, že poslední systém zadržuje po dvou hodinách asi 60% léčiva v kyselém prostředí a pomalu ho uvolňuje v neutrálním prostředí, a proto je tento roztok vhodný perorální dodávání léků [25].

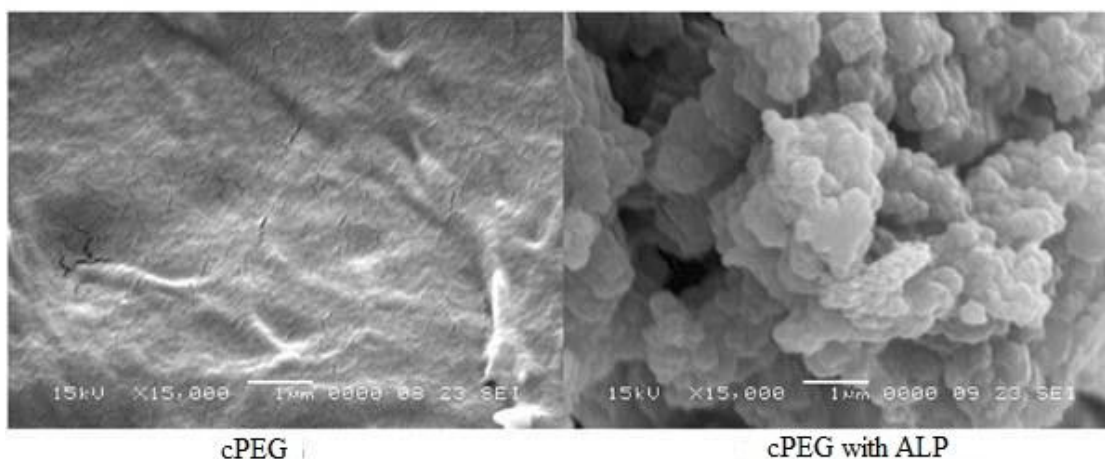
D. Saraydin a spol. se ve své práci zabývali vlivem absorbované dávky a obsahu kyseliny malonové (MAc) v hydrogelech akrylamidu (AAm) na bobtnavé vlastnosti hydrogelu. Různé množství kyseliny malonové (MAc), které obsahovali hydrogely akrylamidu (AAm) byly získány ve formě tyčinek pomocí radiační techniky. Experimenty bobtnání byly prováděny ve vodě při teplotě 25 °C, gravimetricky. Bylo zjištěno, že i při relativně nízkých množstvích MAc během polymerace a zesílení a při nízké dávce ozáření se významně zvyšuje bobtnavé chování hydrogelů AAm / MAc oproti čistým hydrogelům AAm. Práce by mohla podpořit syntézu nových hydrogelů, kde jsou některé funkce požadovány, pro specifické účely. Hydrogely mohou být použity k přepravě látek ve vodním prostředí pro farmaceutické, zemědělské, environmentální a biomedicínské aplikace [27].

Tým **Timothyho E. L. Douglase a spol.** studoval inkorporaci alkalické fosfatázy (ALP) do hydrogelu a schopnost mineralizace. Hydrogely postrádají schopnost mineralizovat s fosforečnanem vápenatým (CaP) a vytvářet silné interakce s tvrdými tkáněmi, jako jsou kosti, avšak nedávný trend v tkáňovém inženýrství zahrnuje vývoj hydrogelů se schopností mineralizovat a to právě díky inkorporaci ALP do hydrogelu. ALP je enzym, který se podílí na mineralizaci kostí štěpením fosfátu z organického fosfátu. Použití ALP k indukci homogenní mineralizace hydrogelů za účelem zvýšení jejich mechanické pevnosti nebo jejich

přijatelnosti pro aplikace náhrady kostí je alternativou k zabudování částic CaP. V této studii byl ALP inkorporován do tří zajímavých hydrogelů pro aplikace pro tkáňové inženýrství, jmenovitě katechol-polyethylenglykol (cPEG), kolagen typu I a kopolymer PEG a kyseliny fumarové (OPF). Indukcí enzymatické mineralizace tří různých hydrogelů (jeden přírodní (kolagen) a dva syntetické (cPEG, OPF)) bylo zamýšleno ukázat použitelnost tohoto přístupu na širokou škálu hydrogelů. Dalším cílem této studie bylo porovnat schopnost hydrogelů tvořit minerály jako funkci jejich chemických strukturálních rozdílů. ALP byl přidán před tvorbou gelu za předpokladu, že by byl do určité míry zachycen v síti zesítěného polymeru. Tato strategie zachycení ALP během gelace je univerzálně použitelná na všechny hydrogely a zabráňuje použití potenciálně toxických zesítujících činidel, která mohou také měnit enzymovou aktivitu během chemické imobilizace enzymu na gel. Po inkorporaci ALP byly gely inkubovány v roztoku vápenatého glycerofosfátu (Ca-GP). Ca-GP difundoval do membrány, kde se působením ALP uvolňoval fosfát, který reagoval s ionty vápníku za vzniku fosforečnanu vápenatého (CaP). Princip je schematicky znázorněn na Obrázek 9.

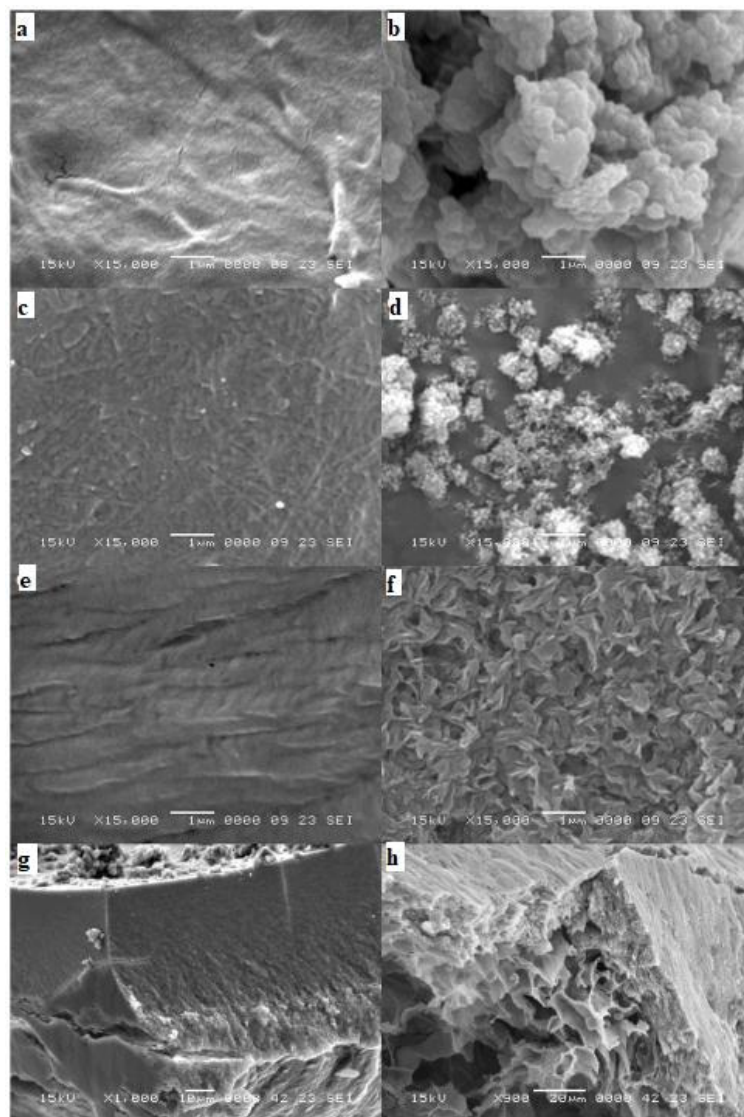


Enzymatic mineralization of hydrogel with calcium phosphate (CaP)



Obrázek 9: Základní princip mineralizace enzymatickým působením zachycené alkalické fosfatázy (ALP). Glycerofosfát vápenatý (Ca-GP) difunduje do hydrogelů se zabudovaným ALP. Uvnitř hydrogelu se glycerol (GP) štěpí na fosfát (P) pomocí ALP, který následně reaguje s ionty Ca^{2+} za vzniku nerozpustného fosforečnanu vápenatého (CaP), který zůstává uvnitř hydrogelu [28].

Tato práce ukázala proveditelnost indukovaní tvorby CaP v různých hydrogelech a zlepšení mechanických vlastností hydrogelu inkorporací ALP během tvorby hydrogelu a následnou inkubací v roztoku Ca-GP bez nutnosti imobilizace ALP zesíťením. Právě pomocí inkubace v roztoku Ca-GP a metod FTIR, EDS, SEM, XRD, SAED, ICP-OES a barvení von Kossa byla potvrzena tvorba CaP. Množství vytvořeného minerálu klesá v pořadí cPEG> kolagen> OPF, zatímco poměr minerální: polymer jako míra polymerní minerální formovací kapacity se snížil v pořadí: kolagen> cPEG> OPF [28].



Obrázek 10: SEM obrázky lyofilizovaných hydrogelů obsahujících ALP v koncentracích 0 (a, c, e) a 2,5 (b, d, f) $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ mineralizovaných po dobu 6 dnů. a, b: cPEG; c, d: kolagen; e, f: OPF. Jsou také znázorněny řezy cPEG (g) a OPF (h) obsahující 2,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ALP [28].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Azoalbumin:	Sigma Aldrich č. šarže: SLBS9717 CAS: 102110-73-6
Bromelain	Sigma Aldrich č. šarže: BCBW0568 CAS: 37189-34-7
Kolagenasa	EMD Millipore Corp č. šarže: 3099012 CAS: 9001-12-1
Septonex ((karbethopendecinium bromid)	GNB chem, a.s. č. šarže: 511SEP003 CAS: 10567-02-9
Hyaluronan sodný	Contipro Biotech s.r.o. 250-450 kDa $M_w = 350$ kDa Vlhkost: 7,863 % č. šarže: 230215-E1
Kyselina trichloroctová	Lach-Ner, s.r.o. č. šarže: PP/2013/02095 CAS: 76-03-9
Hydroxid sodný	PENTA Č. šarže: 1810241013 CAS: 011-002-00-6
Chlorid sodný	PENTA Č. šarže: 2106210616 CAS: 7647-14-5

4.2 Stanovení enzymové aktivity

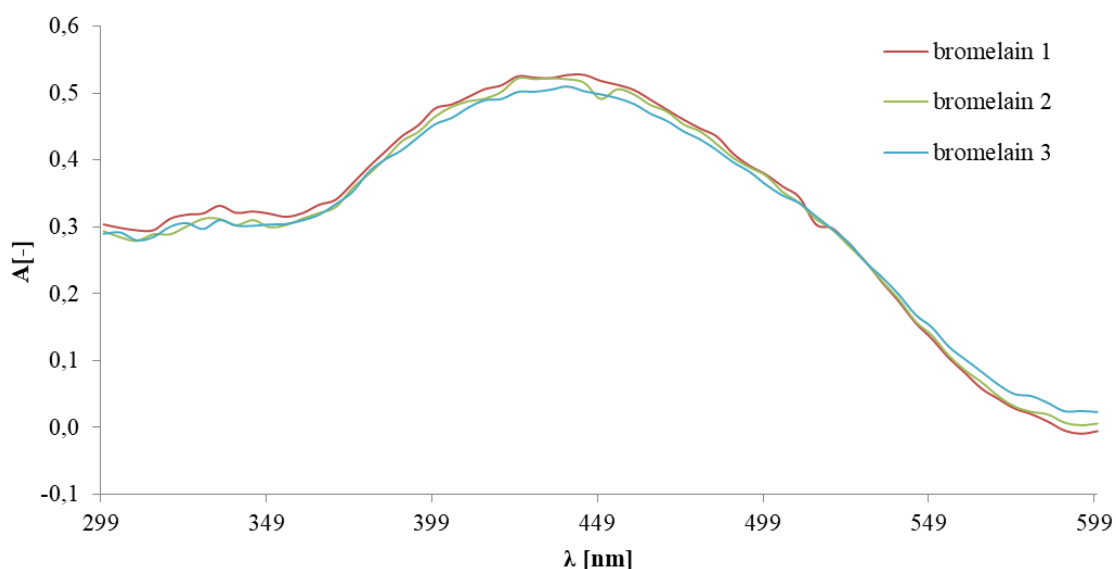
Pro stanovení enzymové aktivity bromelainu a kolagenasy, byl jako substrát použit roztok azoalbuminu. Azoalbumin je modifikovaný protein albumin s navázanou sulfanilamidovou skupinou. Enzymatická hydrolýza vede k uvolňování barevných peptidů, které jsou rozpustné v kyselině trichloroctové, a následně detekovány při 440 nm [30]. Jednotka aktivity je pak charakterizována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu za podmínek testu [29].

Ke 100 μ l roztoku azoalbuminu o koncentraci 5 mg/ml bylo přidáno 100 μ l roztoku enzymu o koncentraci 1 mg/ml a vzorky byly inkubovány po dobu 60 min při 37 °C. Reakce

byla ukončena přidáním 410 µl 10% kyseliny trichloroctové a vzorky byly zcentrifugovány při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 2 minut. Do kyvety bylo napipetováno 500 µl supernatantu a bylo k němu přidáno 700 µl NaOH o koncentraci 1 M a změřena absorbance při 440 nm proti blanku na spektrofotometru Varian. Jako blank byl použit vzorek, u kterého byla reakce ukončena ještě před inkubací.

4.3 UV-VIS spektrofotometrie

Měření absorbance bylo provedeno na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary50 Probe. Pro měření byla použita zúžená křemenná kyveta. Princip této metody byl popsán v kapitole 2.8. UV-VIS spektrofotometr byl použit pro měření absorbance za účelem stanovení enzymové aktivity bromelainu a kolagenasy. Spektrum se snímalo v rozmezí vlnových délek od 300 nm do 600 nm. Ve spektru byly zaznamenávány hodnoty absorbance barevných peptidů, které vznikají při enzymatické hydrolyze. Pro výpočet aktivity enzymu byla vybrána absorbance při 440 nm, protože právě při této vlnové délce je absorbance maximální (Obrázek 11).



Obrázek 11: Graf závislosti absorbance vzorku bromelainu na vlnové délce

Pro výpočet aktivity enzymu byl použit vzorec:

$$a = \left(\frac{A \cdot 1000}{t} \right) \cdot 10, \quad (3)$$

kde A je absorbance a t je čas inkubace v minutách.

4.4 Stanovení enzymové aktivity s přidáním Septonexu

4.4.1 Příprava zásobních roztoků

Pro stanovení enzymové aktivity s přidavkem Septonexu byl připraven zásobní roztok Septonexu ve fyziologickém roztoku (0,15 M NaCl), který byl připraven rozpuštěním 4,380 g NaCl v 500 ml deionizované vody. Příprava zásobního roztoku Septonexu o koncentraci 222,22 mM se skládala z navážení 9,388 g Septonexu a rozpuštění tohoto množství ve 100 ml fyziologického roztoku. Připravený zásobní roztok byl ponechán na magnetické míchačce

24 hodin z důvodu úplného rozpuštění a dokonalého promíchání. Stejným způsobem byly připraveny i roztoky Septonexu o koncentraci 11,11 mM a 1,11 mM. Lišilo se to jen v množství 0,15 M roztoku NaCl. Roztoky Septonexu o koncentraci 11,11 mM a 1,11 mM byli rozpuštěny v 5 ml fyziologického roztoku.

4.4.2 Stanovení enzymové aktivity s přidavkem Septonexu

Koncentrační řady pro stanovení enzymové aktivity obsahovaly enzym bromelain nebo kolagenasu a kationaktivní tenzid Septonex. Enzym o koncentraci 10 mg/ml byl v množství 100 μ l napipetován do suchých čistých a označených vialek. Následně bylo do vialek přidáno přesné množství roztoku Septonexu dle dané koncentrační řady. Poté byl zbylý objem vialky doplněn na 1 ml pomocí 0,15 M roztoku NaCl. Nakonec byly vialky zavičkovány a promíchány na vortexu. Výsledné koncentrační řady obsahovaly enzym o koncentraci 1 mg/ml a proměnlivou koncentraci Septonexu v rozmezí 20-200 mM a 0,005-5 mM. Posledním krokem bylo měření enzymové aktivity stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.2.



Obrázek 12: Koncentrační řada vzorků s enzymem kolagenasou a Septonexem.

4.5 Stanovení enzymové aktivity s přidáním hyaluronanu

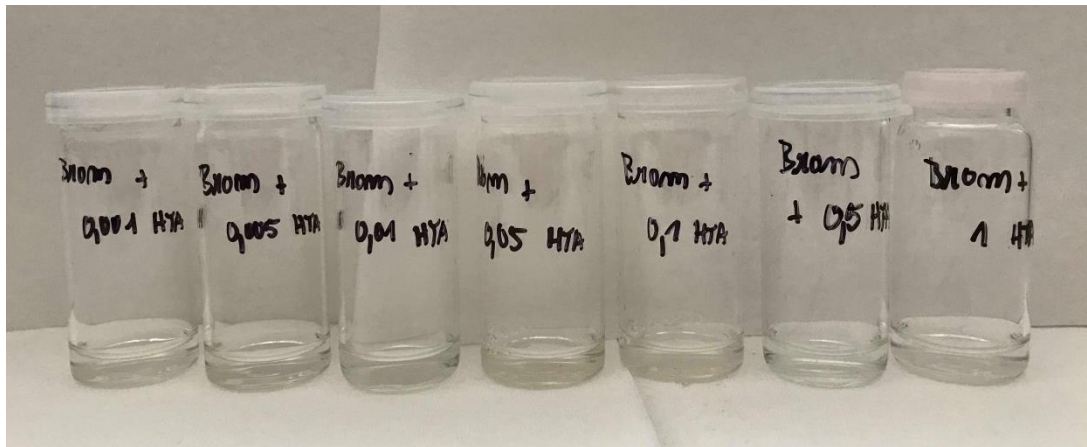
4.5.1 Příprava zásobních roztoků

Pro stanovení enzymové aktivity s přidavkem hyaluronanu byl připraven zásobní roztok Hya ve fyziologickém roztoku, který byl připraven rozpuštěním 4,38 g NaCl v 500 ml deionizované vody. Příprava zásobního roztoku hyaluronanu o koncentraci 1,11 g/l se skládala z navážení 0,033 g hyaluronanu a rozpuštění tohoto množství ve 30 ml fyziologického roztoku. Připravený zásobní roztok byl ponechán na magnetické míchačce 24 hodin z důvodu úplného rozpuštění a dokonalého promíchání. Stejným způsobem byl připraven i roztok hyaluronanu o koncentraci 0,011 g/l. Rozdíl byl v navážce hyaluronanu a v množství fyziologického roztoku (100 ml), ve kterém se hyaluronan rozpouštěl.

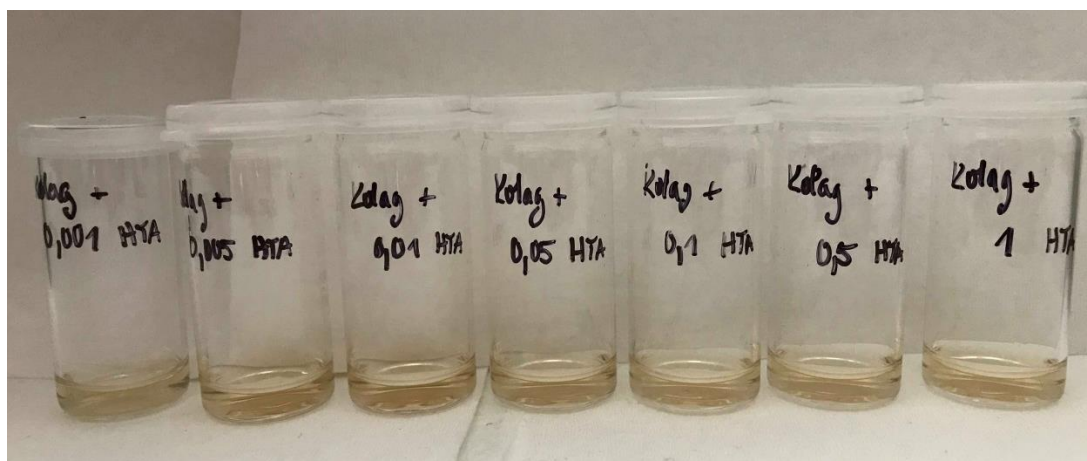
4.5.2 Stanovení enzymové aktivity s přidavkem hyaluronanu

Koncentrační řady pro stanovení enzymové aktivity obsahovaly enzym bromelain nebo kolagenasu a polyelektrolyt hyaluronan. Nejdříve byl postup stejný jako v odstavci 4.5.2, enzym o koncentraci 10 mg/ml byl v množství 100 μ l napipetován do vialek. Po napipetování bylo do vialek přidáno přesné množství roztoku hyaluronanu dle dané koncentrační řady. Poté

byl zbylý objem vialky doplněn na 1 ml pomocí 0,15 M roztoku NaCl. Nakonec byly vialky zavičkovány a promíchány na vortexu. Výsledné koncentrační řady obsahovaly enzym o koncentraci 1 mg/ml a proměnlivou koncentraci hyaluronanu v rozmezí 0,001-1 g/l. Posledním krokem bylo měření enzymové aktivity stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.2.



Obrázek 13: Koncentrační řada vzorků s enzymem bromelainem a hyaluronanem.



Obrázek 14: Koncentrační řada vzorků s enzymem kolagenasou a hyaluronanem.

4.6 Stanovení enzymové aktivity ve směsi

4.6.1 Příprava směsi a stanovení enzymové aktivity

Směs Hya, Septonexu a enzymu byla připravena suchou cestou. Metoda suché cesty spočívala v navážení všech komponentů na analytických vahách do suchých a čistých vialek. Bylo naváženo dané množství Hya, aby výsledná koncentrace byla 0,1 %. Poté bylo naváženo konkrétní množství enzymu, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml a nakonec bylo na analytických vahách naváženo příslušné množství Septonexu, aby bylo dosaženo požadované koncentrace. Následně bylo do vialky s naváženým množstvím všech komponentů napipetováno 6 ml roztoku 0,15 M NaCl. Koncentrační řada Septonexu ve vialkách byla 0,32; 0,63; 1,25 a 2,50 mM. Vialky byly zavičkovány, krátce promíchány na vortexu a poté byly ponechány minimálně 24 hodin na třepače.

Stanovení enzymové aktivity bylo provedeno tak, že bylo odebráno 100 μ l supernatantu a následně byla měřena enzymová aktivita stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.2.

4.7 Stanovení enzymové aktivity v hydrogelu

4.7.1 Příprava hydrogelů a stanovení enzymové aktivity

Hydrogely byly připraveny stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.6.1. Rozdíl byl jen v naváženém množství Hya (2 hm. %) a v naváženém množství Septonexu (200 mM). Poté k tomu bylo přidáno požadované množství enzymu a to o koncentraci 10 mg/ml. Nakonec bylo do vialek s naváženým množstvím všech složek napipetováno 6 ml roztoku 0,15 M NaCl a vialky byly zavíčkované, promíchány na vortexu a ponechány minimálně 24 hodin na třepačce.

Měření enzymové aktivity pak probíhalo tak, že na vytvořený hydrogel ve vialkách byla nalita směs substrátu s 0,15 M NaCl. Vialky s hydrogelem byly inkubovány hodinu při 37 °C a poté bylo odebráno požadované množství supernatantu. Následně byla enzymová aktivita měřena stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.2. Měření bylo opakováno po 2, 3 a 4 hodinách inkubace. Jako blank bylo použito odebrané požadované množství směsi nalité na hydrogel ještě před inkubací.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Aktivita enzymů

Pro porovnání aktivit enzymů s přidavky složek hydrogelu, s aktivitou enzymů ve směsi a v hydrogelu bylo potřeba stanovit enzymovou aktivitu samotného enzymu. Pro stanovení enzymové aktivity byla využita metoda uvedená v kapitole 4.2. Výsledná aktivita byla vyjádřena jako množství substrátu rozloženého působením enzymu vztažené na čas a množství supernatantu [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]. Nejprve byla aktivita enzymu zjišťována při koncentraci enzymu bromelainu 1 mg/10 ml za účelem optimalizace metody. Pro tuto koncentraci byla aktivita enzymu bromelainu stanovena na $6,16\pm0,33 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledná hodnota aktivity enzymu byla velmi nízká a z tohoto důvodu byla koncentrace enzymu zvýšena na 1 mg/ml. Výsledky pro koncentraci 1 mg/ml enzymu jsou uvedeny v následující Tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledná aktivita enzymu bromelainu a kolagenasy o koncentraci 1 mg/ml.

Bromelain				
A ₁ [-]	A ₂ [-]	A ₃ [-]	Průměr A [-]	a [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]
0,527	0,521	0,510	0,519±0,009	86,55±1,44
Kolagenasa				
A ₁ [-]	A ₂ [-]	A ₃ [-]	Průměr A [-]	a [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]
0,293	0,294	0,296	0,294±0,002	49,05±0,25

V Tabulce 1 již můžeme vidět, že aktivita bromelainu je dostačující ve srovnání s hodnotou, která je udávána výrobcem ($> 3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) a s hodnotou naměřené aktivity v diplomové práci Ing. Jitky Bokrové [29]. Tato naměřená aktivita se tedy pohybuje v rozmezí těchto dvou srovnávacích, a proto je dostačující. Aktivita kolagenasy byla měřena jako nespecifická proteolytická aktivita a to z důvodu použitého substrátu, který není pro kolagenasu specifický. Hodnota aktivity kolagenasy je také dostačující v porovnání s hodnotou naměřené aktivity v diplomové práci Ing. Jitky Bokrové [29]. Výsledná aktivita je dále používána jako hodnota referenční.

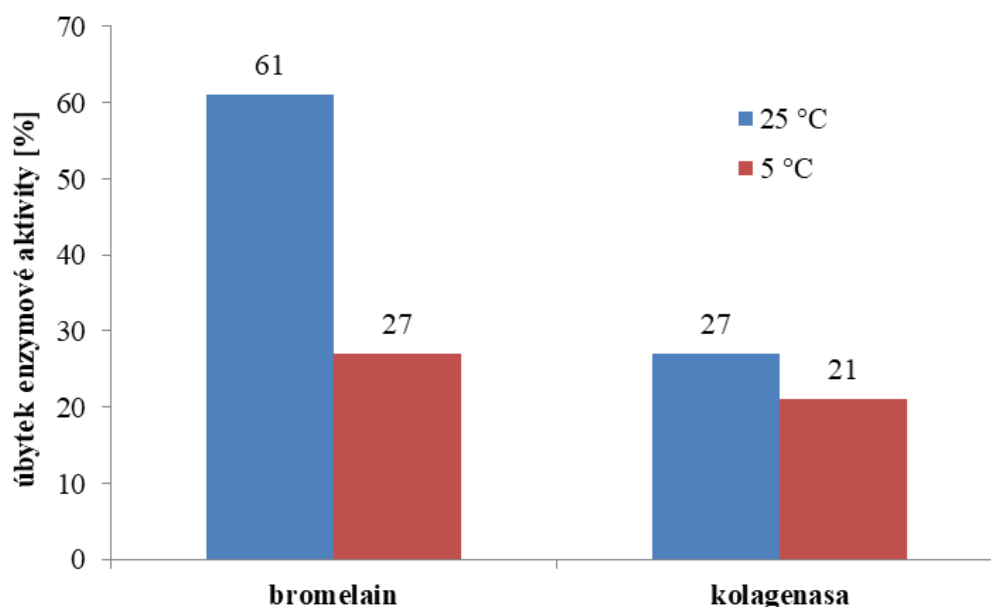
5.2 Aktivita enzymů při dlouhodobém skladování

Byla měřena aktivita enzymů při dlouhodobém skladování, kdy byl enzym v roztoku ponechán při laboratorní teplotě (25 °C) a při 5 °C po dobu 6 dní. V následující Tabulce 2 jsou uvedeny výsledky měření.

Tabulka 2: Aktivita enzymů po 6 dnech uchovávání při laboratorní teplotě a při teplotě 5 °C.

Bromelain					
T [°C]	A ₁ [-]	A ₂ [-]	A ₃ [-]	Průměr A [-]	a [μmol·min ⁻¹ ·ml ⁻¹]
25	0,212	0,205	0,194	0,204±0,009	33,94±1,51
5	0,372	0,373	0,386	0,377±0,008	62,83±1,30
Kolagenasa					
T [°C]	A ₁ [-]	A ₂ [-]	A ₃ [-]	Průměr A [-]	a [μmol·min ⁻¹ ·ml ⁻¹]
25	0,219	0,217	0,211	0,216±0,004	36,00±0,69
5	0,226	0,231	0,243	0,233±0,009	38,89±1,46

Z Tabulky 2 lze vyčíst, že hodnoty aktivit enzymů, které byly uchovávány po dobu 6 dnů při 5 °C, jsou vyšší než hodnoty aktivit enzymů, které byly uchovávány při laboratorní teplotě. Je to dáno tím, že enzymy při laboratorní teplotě rychleji degradují, a proto ztrácejí svojí proteolytickou aktivitu. Pro dlouhodobé uchovávání je tedy lepší skladovat vzorky, ve kterých je obsažen enzym, v lednici. V porovnání s referenční hodnotou enzymové aktivity bylo zjištěno, že u bromelainu enzymová aktivita klesá, i když je skladován v lednici, zatímco u kolagenasy ta změna není tak výrazná. Je to dáno tím, že bromelain je celkově víc citlivý na změnu teploty než kolagenasa, proto se také standardně uchovává v mrazáku, zatímco kolagenasa v ledničce. Na následujícím Obrázku 15 si lze všimnout, že při týdenním skladování při 25 °C se enzymová aktivita bromelainu snížila o 61 %, zatímco u kolagenasy se snížila jen o 27 %. Při skladování v 5 °C se enzymová aktivita bromelainu snížila o 27 % a u kolagenasy o 21 %.



Obrázek 15: Procentuální úbytek aktivity enzymu v porovnání s referenční hodnotou enzymové aktivity bromelainu i kolagenasy.

5.3 Aktivita enzymů s přidavkem Septonexu

Pro měření aktivity enzymu s přidavkem Septonexu byla sestavena kalibrační řada dle postupu v kapitole 4.4.2. o koncentracích od 20-200 mM Septonexu. Z výsledků v Tabulce 3 a Tabulce 4 lze vyčíst, že Septonex o těchto koncentracích výrazně negativně ovlivňuje aktivitu enzymu tím, že degraduje enzym, a proto nebyla naměřena absorbance a z ní vypočítána aktivita enzymu.

Tabulka 3: Aktivita enzymu bromelainu s přidavkem Septonexu o koncentraci 20-200 mM.

Bromelain		
c_{Sept.} [mM]	Průměr A [-]	a [μmol·min⁻¹·ml⁻¹]
20	0,0000	nd
40	-0,0068	nd
60	0,0050	0,833
80	0,0070	1,167
100	-0,0087	nd
120	0,0070	1,167
140	0,0022	0,367
160	-0,0067	nd
180	-0,0061	nd
200	0,0137	2,283

nd - nedetekováno

Tabulka 4: Aktivita enzymu kolagenasy s přidavkem Septonexu o koncentraci 20-200 mM. Hodnota absorbance označená tučně se nedá použít, jelikož při napipetování vzorku do kyvety došlo k nasátí usazeniny a tím vzrostla absorbance a spolu s tím aktivita.

Kolagenasa		
c_{Sept.} [mM]	Průměr A [-]	a [μmol·min⁻¹·ml⁻¹]
20	-0,00175	nd
40	-0,0013	nd
60	-0,0049	nd
80	0,0029	0,492
100	-0,0113	nd
120	-0,0024	nd
140	-0,0059	nd
160	-0,0031	nd
180	0,0821	13,679
200	-0,0063	nd

nd - nedetekováno

Vyšší koncentrace Septonexu tedy nebyly vhodné, a proto byla koncentrace Septonexu snížena a byla vytvořena nová koncentrační řada o hodnotách 0,005-5 mM. U vzorků s koncentrací 0,005-1 mM byla naměřena proteolytická aktivita jak u enzymu bromelainu, tak i u kolagenasy. U koncentrace 5 mM Septonexu už aktivita enzymu znatelně klesala. Je to

dáno tím, že při velmi nízkých koncentracích Septonex nedegraduje enzym právě díky svému malému množství ve vzorku. V porovnání s referenční hodnotou enzymové aktivity výrazněji poklesla aktivita bromelainu a to i ve srovnání s aktivitou kolagenasy. Důvodem je vyšší stabilita enzymu kolagenasy než stabilita bromelainu. Výsledky aktivity enzymů s přidavkem Septonexu o nižších koncentracích jsou zaznamenány v následující Tabulce 5 a Tabulce 6.

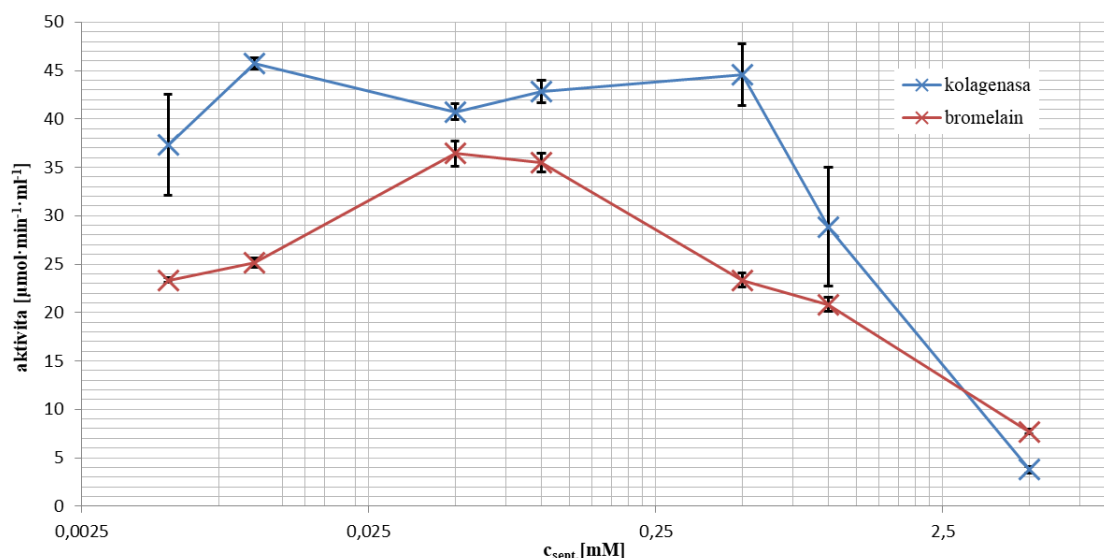
Tabulka 5: Aktivita enzymu bromelainu s přidavkem Septonexu o koncentraci 0,005-5 mM.

Bromelain			
c_{Sept.} [mM]	Průměr A [-]	Odchylka [-]	a [μmol·min⁻¹·ml⁻¹]
0,005	0,146	0,001	23,33±0,24
0,01	0,151	0,003	25,17±0,47
0,05	0,219	0,008	36,42±1,30
0,1	0,213	0,006	35,50±0,94
0,5	0,140	0,004	23,33±0,71
1	0,125	0,004	20,83±0,71
5	0,046	0,001	7,67±0,24

Tabulka 6: Aktivita enzymu kolagenasy s přidavkem Septonexu o koncentraci 0,005-5 mM.

Kolagenasa			
c_{Sept.} [mM]	Průměr A [-]	Odchylka [-]	a [μmol·min⁻¹·ml⁻¹]
0,005	0,224	0,031	37,33±5,19
0,01	0,275	0,004	45,75±0,59
0,05	0,245	0,005	40,75±0,82
0,1	0,257	0,007	42,83±1,18
0,5	0,268	0,019	44,58±3,18
1	0,173	0,037	28,83±6,19
5	0,023	0,002	3,75±0,35

Z hodnot enzymových aktivit v Tabulce 5, Tabulce 6 a i z následujícího Obrázku 16 je patrné, že koncentrace Septonexu pro přípravu hydrogelu by se měly pohybovat pod 1 mM, aby nedošlo k degradaci enzymu.



Obrázek 16: Závislost aktivity enzymu na koncentraci Septonexu

5.4 Aktivita enzymů s přidavkem hyaluronanu

Byla připravena koncentrační řada hyaluronanu podle postupu, který je popsán v kapitole 4.5.2. Pro každou koncentraci hyaluronanu byla změřena absorbance a vypočítána hodnota aktivity enzymů. Předpoklad byl takový, že hyaluronan nebude nijak ovlivňovat aktivitu enzymu. Tento předpoklad byl potvrzen u kolagenasy, ale enzymová aktivita bromelainu ovlivněna byla. První hypotézou proč by to tak mohlo být je, že snížení aktivity je dáno pomalou difuzí enzymů k substrátu skrz viskóznější prostředí hyaluronanu. Druhou hypotézou je, že došlo k navázání enzymu na hyaluronan a tím se snížila jeho aktivita. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách.

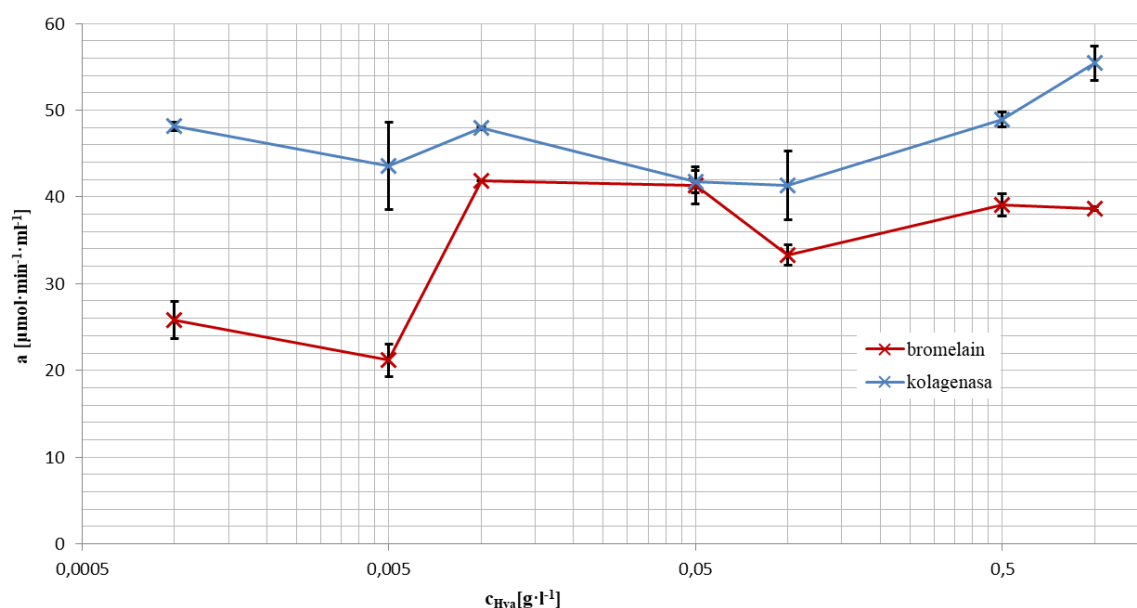
Tabulka 7: Aktivita enzymu bromelainu s přidavkem hyaluronanu o koncentraci 0,001-1 g/l.

Bromelain			
$c_{\text{Hva}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	Průměr A [-]	Odchylka [-]	$a [\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}]$
0,001	0,155	0,013	25,83±2,12
0,005	0,127	0,011	21,17±1,89
0,01	0,251	0,000	41,83±0,00
0,05	0,248	0,013	41,33±2,12
0,1	0,200	0,007	33,33±1,18
0,5	0,235	0,008	39,08±1,29
1	0,232	0,001	38,67±0,24

Tabulka 8: Aktivita enzymu kolagenasy s přidavkem hyaluronanu o koncentraci 0,001-1 g/l.

Kolagenasa			
$c_{\text{Hya}}[\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	Průměr A [-]	Odchylka [-]	$a [\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}]$
0,001	0,289	0,003	48,17±0,47
0,005	0,262	0,030	43,58±5,07
0,01	0,288	0,001	47,92±0,12
0,05	0,251	0,008	41,75±1,29
0,1	0,248	0,024	41,33±4,00
0,5	0,293	0,005	48,92±0,82
1	0,333	0,012	55,42±2,00

Z Obrázku 17 je patrné, že enzymová aktivita kolagenasy přidavkem Hya ovlivněna nebyla v porovnání s referenční hodnotou aktivity enzymu, naopak enzymová aktivita bromelainu se snížila. Opět je to dáno tím, že kolagenasa je mnohem stabilnější enzym než bromelain, jak už bylo potvrzeno i při stanovení dlouhodobé stability enzymu a výsledky z experimentu stanovení vlivu Septonexu na aktivitu enzymů.



Obrázek 17: Závislost aktivity enzymů na koncentraci Hya.

5.5 Aktivita enzymů ve směsi

Aktivita enzymu byla sledována ve směsi všech komponentů po 24 hodinách od doby přípravy. Směs byla připravena pouze metodou suché cesty, smícháním optimálních hodnot koncentrací pro zachování aktivity enzymů, z důvodu ochrany enzymu. Předpokládalo se, že pokud jednotlivé složky směsi budou smíchány v suché formě, tak enzym nezdegraduje. Předpoklad byl potvrzen, protože po vytvoření směsi suchou cestou zůstal enzym aktivní. V následující Tabulce 9 a Tabulce 10 jsou uvedeny výsledky měření.

Tabulka 9: Aktivita enzymu bromelainu ve směsi.

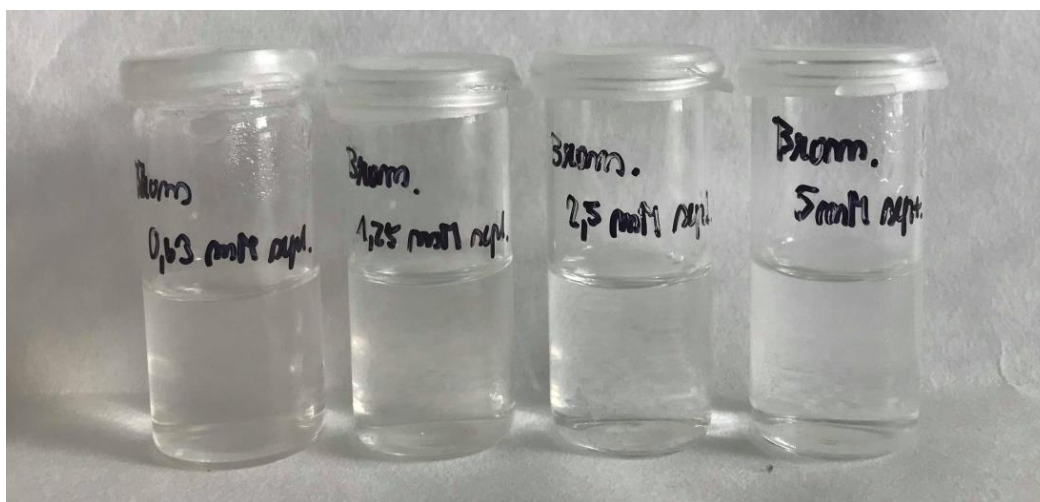
Bromelain			
c _{Sept.} [mM]	Průměr A [-]	Odchylka [-]	a [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]
0,32	0,139	0,0035	23,08±0,59
0,63	0,206	0,0113	34,33±1,89
1,25	0,194	0,0072	32,39±1,21
2,50	0,175	0,0106	29,08±1,77

Tabulka 10: Aktivita enzymu kolagenasy ve směsi.

Kolagenasa			
c _{Sept.} [mM]	Průměr A [-]	Odchylka [-]	a [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]
0,32	0,144	0,0148	23,92±2,47
0,63	0,162	0,0000	27,00±0,00
1,25	0,130	0,0078	21,58±1,30
2,50	nd	nd	nd

nd – nedetekováno

Dalším předpokladem bylo, že při smíchání všech komponentů dojde ke vzniku hydrogelu. Předpoklad potvrzen nebyl, protože při smíchání tak nízkých koncentrací Septonexu (0,32 a 0,63 mM) s Hya nedošlo ke tvorbě hydrogelu. U koncentrací 1,25 a 2,50 mM docházelo k tvorbě velmi malé vrstvy gelu na okrajích vialky. Z důvodu nevytvoření hydrogelu byla aktivita enzymu měřena pouze ve směsi. Směsi a tenké vrstvy gelu u vyšších koncentrací jsou znázorněny na Obrázku 18 a Obrázku 19.



Obrázek 18: Ukázky směsí připravené smícháním Hya o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, Septonexu o čtyřech různých koncentracích (vždy zleva 0,32; 0,63; 1,25 a 2,50 mM Septonex) a enzymu bromelainu po 24 hodinách od jejich přípravy.



Obrázek 19: Ukázky směsí připravené smícháním Hya o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, Septonexu o čtyřech různých koncentracích (vždy zleva 0,32; 0,63; 1,25 a 2,50 mM Septonex) a enzymu kolagenasy po 24 hodinách od jejich přípravy.

Na Obrázku 18 a Obrázku 19 si lze také všimnout, že jsou směsi s koncentrací Septonexu 0,32 mM a 0,63 mM silně zakalené. Při vzniku hydrogelu se část tenzidu spotřebuje na zesíťování s Hya. Další část, která se nepodílí na gelaci, interaguje s nadbytečným Hya a donutí ho se sbalit a částečně tak vykompenzovat náboj Hya. Zákal tedy vzniká z důvodu nízké koncentrace Septonexu, kdy není v takovém nadbytku, aby mohl vykompenzovat náboj Hya a ve směsi se tak nachází právě hyaluronan, který způsobuje zakalení. Lehce zakalená směs vznikala při použití 1,25 mM a 2,50 mM Septonexu.

5.6 Aktivita enzymů v hydrogelu

K určení enzymové aktivity v hydrogelu byl fázově separovaný hydrogel připraven metodou suché cesty. Příprava hydrogelu a měření enzymové aktivity je popsáno v kapitole 4.7.1. Měření probíhalo po 1, 2, 3 a 4 hodinách inkubace a v následujících tabulkách jsou zaznamenány výsledky měření.

Tabulka 11: Enzymová aktivita bromelainu v hydrogelu po 1, 2, 3 a 4 hodinách inkubace.

Bromelain			
Čas inkubace [h]	Průměr A [-]	Odchylka [-]	a [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$]
1	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd
4	0,003	0,0021	0,13±0,09

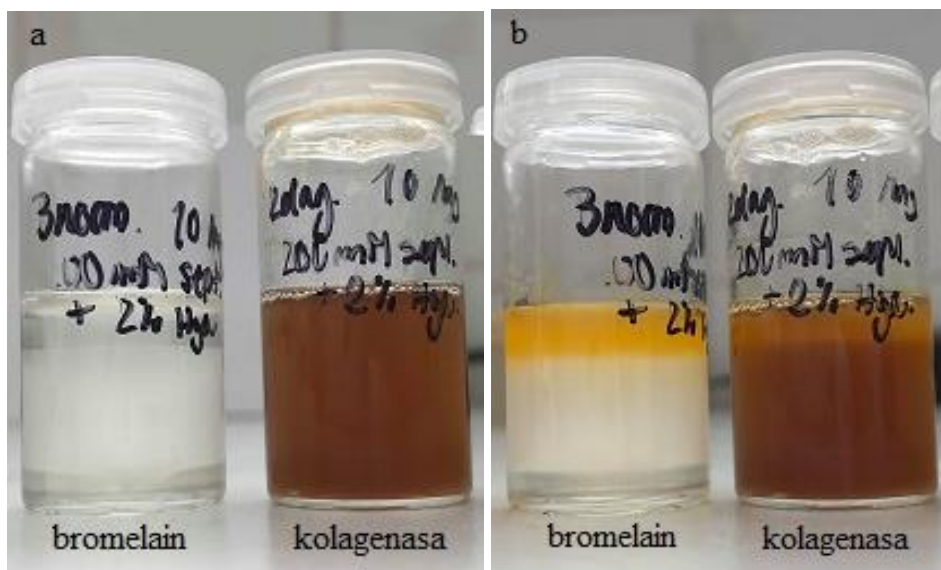
nd – nedetekováno

Tabulka 12: enzymová aktivita kolagenasy v hydrogelu po 1, 2, 3 a 4 hodinách inkubace.

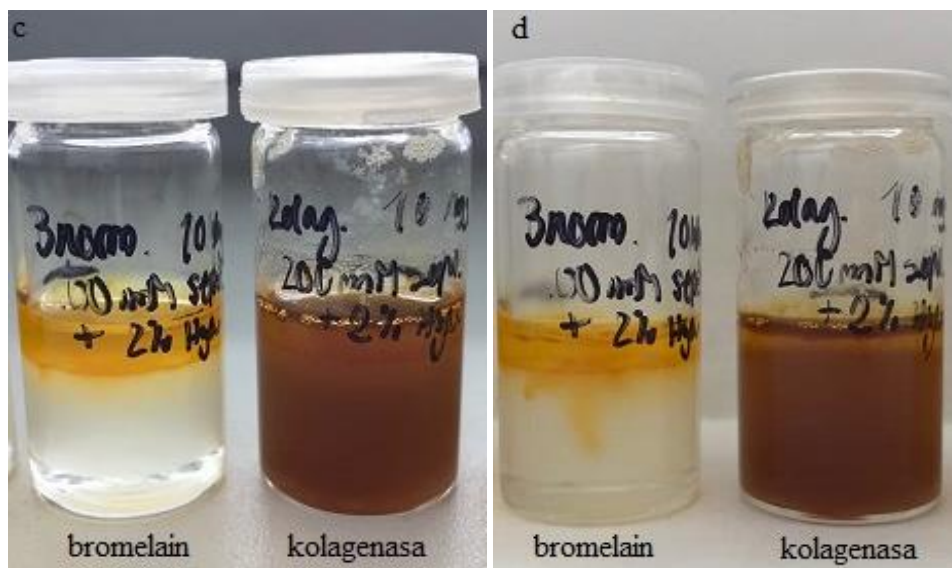
Kolagenasa			
Čas inkubace [h]	Průměr A [-]	Odchylka [-]	a [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$]
1	0,048	0,0123	8,05±2,05
2	0,074	0,0045	6,14±0,37
3	0,085	0,0009	4,70±0,05
4	0,106	0,0140	4,43±0,58

Z výsledků je patrné, že na enzym bromelain více působil Septonex takže degradoval, dále také mohl být pevněji vázan s hyaluronanem a tím ovlivněn gelem a z tohoto důvodu nebyla detekována enzymová aktivita. Tímto experimentem byly potvrzeny i výsledky z předchozích měření, kdy byla prokázána nižší stabilita bromelainu. Z tohoto důvodu je bromelain nevhodný pro použití v hyaluronových hydrogelech. U kolagenasy byla nejvyšší aktivita naměřena po hodině inkubace, hned ze začátku po uvolnění enzymu do roztoku substrátu nad gelem. Po uvolnění z gelu byl enzym aktivní, ale uvolňoval se do roztoku soli, takže mohl postupně degradovat. Dochází k tomu, že má enzym na počátku vysokou aktivitu a postupem času se uvolňují další molekuly enzymu a celková aktivita pomalu klesá. Po dobu 4 hodin má však dostatečnou aktivitu, aby mohl být použit pro aplikaci ve formě krytí rány.

Na následujícím Obrázku 20, Obrázku 21 a Obrázku 22 jsou připravené hydrogely, které byly použity pro stanovení aktivity enzymů.

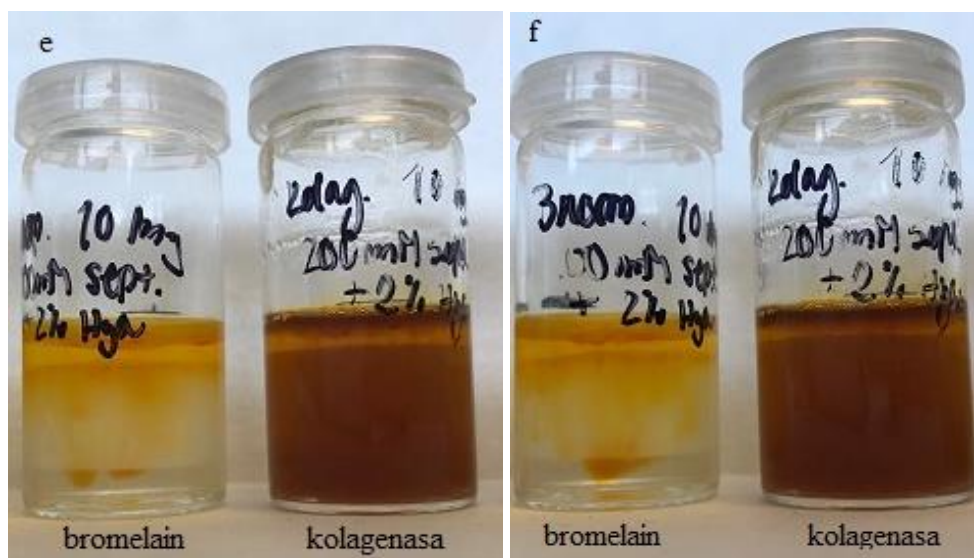


Obrázek 20: Ukázky hydrogelů připravených smícháním Hya o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, Septonexu o koncentraci 200 mM a enzymu bromelainu a kolagenasy po 24 hodinách od jejich přípravy. a: samotný hydrogel, b: hydrogel s roztokem substrátu a 0,15 M NaCl ještě před inkubací.



Obrázek 21: Ukázky hydrogelů připravených smícháním Hya o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, Septonexu o koncentraci 200 mM a enzymu bromelainu a kolagenasy po 24 hodinách od jejich přípravy. c: hydrogel po hodině inkubace, d: hydrogel po dvou hodinách inkubace.

V gelu inkubovaném dvě hodiny (Obrázek 21 – c) je patrná difuze substrátu skrz gel. V porovnání s gelem inkubovaným pouze hodinu (Obrázek 21 – d), kdy substrát neměl dostatečnou dobu na to, aby do gelu difundoval, byla naměřena nejvyšší aktivita enzymu kolagenasy. Jedním z možných vysvětlení je, že buď byl enzym uvolňován z gelu a tím se dostával k substrátu a probíhala reakce, nebo byl povrch takto připraveného gelu dostatečně aktivní, kdy na jeho povrchu bylo navázáno takové množství aktivního enzymu, které reagovalo se substrátem, a díky tomu byla naměřena nejvyšší aktivita.



Obrázek 22: Ukázky hydrogelů připravených smícháním Hya o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, Septonexu o koncentraci 200 mM a enzymu bromelainu a kolagenasy po 24 hodinách od jejich přípravy. e: hydrogel po třech hodinách inkubace, f: hydrogel po čtyřech hodinách inkubace.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studium inkorporace enzymů do fázově separovaného hydrogelu, který vznikl interakcí mezi záporně nabitým polyelektrolytem (hyaluronan) a kladně nabitým tenzidem (Septonex), a stanovení proteolytické aktivity enzymů bromelainu a kolagenasy. Enzymová aktivita byla stanovena pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie. Nutnou součástí tohoto experimentu bylo proměření enzymové aktivity samotného enzymu a stanovení vlivu jednotlivých složek hydrogelu na proteolytickou aktivitu enzymu.

Při sledování proteolytické aktivity samotného enzymu byla nejprve stanovena enzymová aktivita bromelainu o koncentraci 1 mg/10 ml na $6,16 \pm 0,33 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Výsledná hodnota aktivity však byla velmi nízká, a proto došlo ke zvýšení koncentrace enzymu na 1 mg/ml. Při zvýšené koncentraci enzymu byla stanovena enzymová aktivita bromelainu na $86,55 \pm 1,44 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ a kolagenasy na $49,05 \pm 0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Jak u bromelainu, tak i u kolagenasy byla tato hodnota dostačující a dále byla brána jako hodnota srovnávací.

Při sledování proteolytické aktivity enzymů v roztoku při uchovávání po dobu 6 dní při laboratorní teplotě a při 5 °C vykazoval větší stabilitu enzym kolagenasa. Enzymová aktivita kolagenasy poklesla ve srovnání s referenční hodnotou při uchovávání ve 25 °C jen o 27 %, zatímco aktivita bromelainu poklesla o 61 %. Při uchování při 5 °C byl pokles o něco nižší. Aktivita kolagenasy poklesla o 21 % a aktivita bromelainu o 27 %.

Pro stanovení vlivu tenzidu (Septonex) na enzymovou aktivitu byly použity nejprve vysoké koncentrace Septonexu. Bylo zjištěno, že Septonex v takových koncentracích degraduje enzym a díky tomu enzym přestává být aktivní. Proto byla koncentrace Septonexu snížena a došli jsme k závěru, že při nízkých koncentracích Septonexu je enzymová aktivita zachována. Z tohoto důvodu by se koncentrace Septonexu, potřebná k vytvoření hydrogelu, měla pohybovat pod 1 mM, aby nedošlo k degradaci enzymu. Dále bylo zjištěno že kolagenasa je méně citlivá na přítomnost Septonexu než bromelain opět z důvodu stability enzymu.

Při stanovení vlivu hyaluronanu na enzymovou aktivitu nebyl potvrzen předpoklad, že hyaluronan aktivitu enzymu neovlivňuje. Toto tvrzení však neplatí vždy a u enzymu kolagenasy platí opak. U enzymu bromelainu došlo k poklesu aktivity oproti referenční hodnotě a důvodem může být pomalá difuze enzymů k substrátu skrz viskóznější prostředí hyaluronanu. Dalším důvodem je, že se enzym navázal na hyaluronan a tím se snížila aktivita enzymu.

Ke stanovení enzymové aktivity v hydrogelu byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, enzym o koncentraci 1 mg/ml a Septonex o koncentracích 0,32-2,5 mM, jež byly optimální pro aktivitu enzymu. Tyto tři složky byly smíchány v práškové formě tzv. suchou cestou a mělo dojít k tvorbě hydrogelu. K vytvoření však nedošlo z důvodu velmi nízkých koncentrací Septonexu, a proto byla aktivita enzymu měřena ve směsi. Výsledkem tohoto experimentu je enzymová aktivita, která byla sice snížena u obou enzymů, ale zároveň dostatečně zachována.

V poslední řadě nás zajímala aktivita enzymu v hydrogelu. Hydrogel byl připraven opět suchou cestou smícháním Hya o molekulové hmotnosti 250-450 kDa, enzymu o koncentraci 10 mg/ml a Septonexu o koncentraci 200 mM. Z výsledků z předchozích měření vyplývá, že bromelain je málo stabilní enzym, což bylo potvrzeno i u tohoto stanovení tím, že enzymová

aktivita bromelainu nebyla detekována. Z těchto důvodů je tedy bromelain nevhodný pro použití v hyaluronových hydrogelech pro aplikaci ve formě krytí. Naopak enzymová aktivita kolagenasy naměřena byla a enzym má po dobu 4 hodin dostatečnou aktivitu na to, aby mohl být použit pro aplikaci ve formě krytí rány.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4
- [2] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0449-1.
- [3] Přírodní látky - enzymy. In: Studium biochemie [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2008 [cit. 2018-11-12]. Dostupné z: http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html
- [4] KODÍČEK, Milan. *Studijní materiály z enzymologie*. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0523-4.
- [5] VELLARD, Michel. *The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals*. Current Opinion in Biotechnology. 2003, 14(4), 444-450. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00092-2. ISSN 09581669. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/>
- [6] KAUR, Ramandeep a Bhupinder singh SEKHON. *Enzymes as drugs: an overview*. Journal of Pharmaceutical Education [online]. 2012, 3(2), 29-41 [cit. 2019-03-19]. ISSN 09768173. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=4&sid=3ebd140e-a701-4328-b970-f37f69c0cf3d%40sessionmgr102&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#AN=84626783&db=a9h>
- [7] MAURER, H.R. *Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use*. Cellular and Molecular Life Sciences. 2001, 58(9), 1234-1245. DOI: 10.1007/PL00000936. ISSN 1420-682X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/PL00000936>
- [8] Ananas comosus: Pineapple. World of Flowering Plants [online]. 2013 [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <https://worldoffloweringplants.com/ananas-comosus-pineapple/>
- [9] Collagenase [online]. Lakewood, NJ 08701: Worthington Biochemical Corporation [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/cls/default.html>
- [10] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [11] DAUTZENBERG, H. *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*. Cincinnati: Hanser/Gardner, c1994. ISBN 15-699-0127-9.
- [12] SEL'YANIN, Mikhail A., Petr Ya. BOYKOV, Vladimir N. KHABAROV a Felix POLYAK. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine: The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use*. Hyaluronic Acid [online]. Chichester, UK, 2015, 2015 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1002/9781118695920. ISBN 9781118695920. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118695920.ch1> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118695920.ch1>
- [13] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Biotechnology Letters. 2006, 29(1), 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>

- [14]SVANOVSKÝ, Evžen. *Studium biologického chování derivátů kyseliny hyaluronové*. Hradec Králové, 2010. Disertační práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ.
- [15]ALMOND, A. *Hyaluronan. Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, 64(13), 1591-1596. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z. ISSN 1420-682X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7032-z>
- [16]BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0475-0.
- [17]OTAVOVÁ, Tereza. *Hodnocení účinnosti dezinfekce operačního pole na operačních sálech (mikrobiologická studie)*. Pardubice, 2009. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta zdravotnických studií.
- [18]MOHAMED, Gehad G., M. F. EL-SHAHAT, A. M. AL-SABAGH, M. A. MIGAHED a Tamer Awad ALI. *Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations*. The Analyst. 2011, 136(7), 1488-1495. DOI: 10.1039/c0an00662a. ISSN 0003-2654. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>
- [19]HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. /. Hoboken, NJ: John Wiley, 2003. ISBN 04-714-9883-1.ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. Chemické Listy. 93, 1999, s. 421-427.
- [20]H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications. InTech, 2011, 2011-08-01. DOI: 10.5772/24553. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>
- [21]BAHRAM, Morteza, Naimeh MOHSENI a Mehdi MOGHTADER. *An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. InTech, 2016, 2016-08-24. DOI: 10.5772/64301. ISBN 978-953-51-2509-9. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/emerging-concepts-in-analysis-and-applications-of-hydrogels/an-introduction-to-hydrogels-and-some-recent-applications>
- [22]KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [23]NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
- [24]SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [25]ÜNER, M., G. YENER, S. A. WISSING a R. H. MÜLLER. *Skin moisturizing effect and skin penetration of ascorbyl palmitate entrapped in solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) incorporated into hydrogel*. Pharmazie. 2005, 60(10), 751-755.

- [26] CASADEI, Maria Antonietta, Felice CERRETO, Stefania CESA, Maria GIANNUZZO, Michelle FEENEY, Carlotta MARIANECCI a Patrizia PAOLICELLI. *Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: A new drug delivery system for oral formulations*. International Journal of Pharmaceutics. 2006, 325(1-2), 140-146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.06.012. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306004649>
- [27] SARAYDIN, D., E. KARADAĞ, N. SAHINER a O. GÜVEN. *Incorporation of malonic acid into acrylamide hydrogel by radiation technique and its effect on swelling behavior*. Journal of Materials Science. 2002, 37(15), 3217-3223. DOI: 10.1023/A:1016170630750. ISSN 00222461. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1016170630750>
- [28] DOUGLAS, Timothy E. L., Philip B. MESSERSMITH, Safak CHASAN, et al. *Enzymatic Mineralization of Hydrogels for Bone Tissue Engineering by Incorporation of Alkaline Phosphatase*. Macromolecular Bioscience. 2012, 12(8), 1077-1089. DOI: 10.1002/mabi.201100501. ISSN 16165187. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201100501>
- [29] BOKROVÁ, Jitka. *Příprava enkapsulovaných enzymů pro využití v kosmetice*. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [30] REDDY, C. A. *Methods for general and molecular microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2007. ISBN 15-558-1223-6.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratk

HA	kyselina hyaluronová
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelní oblast
Hya	hyaluronan
AP	askorbylpalmitát
SLN	nanočástice pevných lipidů
NLC	nosiče nanostrukturovaných lipidů
DEX-MA	dextranmethakrylát
MAc	kyselina malonová
AAm	akrylamid
ALP	alkalická fofatáza
CaP	fosforečnan vápenatý
cPEG	katechol – polyethylenglykol
PEG	polyethylenglykol
OPF	kopolymer PEG a kyseliny fumarové
Ca-GP	vápenatý glycerolfosfát
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
EDS	Energeticky disperzní spektroskopie
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
XRD	Rentgenová difrakce
SAED	Elektronová difrakce
ICP-OES	Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem

8.2 Seznam použitých symbolů

A	absorbance
T	transmitance
I	prošlý zářivý tok
I_0	dopadající zářivý tok
c	koncentrace
ϵ	molární absorpční koeficient
l	délka optické dráhy
a	aktivita enzymu
T	teplota
t	čas